

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Cotutelle internationale avec l'Université Libanaise

Présentée et soutenue par :

Rémi SAFI

Le 21 Septembre 2015

Titre : Etude de la férutinine et de ses analogues : hémisynthèse et activité anticancéreuse vis-à-vis des lignées cellulaires hormono-dépendantes

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SDM, Chimie-Biologie-Santé -CO 042

Directeur/trice(s) de Thèse :

Mme Fadia NAJJAR, Université Libanaise

Mme Evelyne DELFOURNE, Université Paul Sabatier

Jury :

Mr Ramez Chahine, Professeur, Université Libanaise

Mr Norbert Bakalara, Professeur, ENSCM, Montpellier

Mme Rihab Nasr, Professeur associé, Université Américaine de Beyrouth

Mr Michel Baltas, Directeur de recherche, CNRS, Université Paul Sabatier

Mr Eric Benoist, Professeur, Université Paul Sabatier

Mme Rania Azar, Professeur, Université Libanaise

Mme Fadia Najjar, Professeur, Université Libanaise

Mme Mona Diab-Assaf, Professeur, Université Libanaise

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de Thèse

Co-encadrante

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Cotutelle internationale avec l'Université Libanaise

Présentée et soutenue par :

Rémi SAFI

Le 21 Septembre 2015

Titre : Etude de la férutinine et de ses analogues : hémisynthèse et activité anticancéreuse vis-à-vis des lignées cellulaires hormono-dépendantes

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SDM, Chimie-Biologie-Santé -CO 042

Directeur/trice(s) de Thèse :

Mme Fadia NAJJAR, Université Libanaise

Mme Evelyne DELFOURNE, Université Paul Sabatier

Jury :

Mr Ramez Chahine, Professeur, Université Libanaise

Mr Norbert Bakalara, Professeur, ENSCM, Montpellier

Mme Rihab Nasr, Professeur associé, Université Américaine de Beyrouth

Mr Michel Baltas, Directeur de recherche, CNRS, Université Paul Sabatier

Mr Eric Benoist, Professeur, Université Paul Sabatier

Mme Rania Azar, Professeur, Université Libanaise

Mme Fadia Najjar, Professeur, Université Libanaise

Mme Mona Diab-Assaf, Professeur, Université Libanaise

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de Thèse

Co-encadrante

Etude de la férutinine et de ses analogues : hémisynthèse et activité anticancéreuse vis-à-vis des lignées cellulaires hormono-dépendantes

Les œstrogènes peuvent favoriser la croissance, la promotion et la progression des cancers hormono-dépendants tels que le cancer du sein, de la prostate et des ovaires. Certains métabolites secondaires de plantes constituent une source importante de phyto-œstrogènes, capables de réduire le risque du cancer en antagonisant les fonctions des hormones. La férutinine (FRT), est une phyto-œstrogène biologiquement active extraite des racines de *Ferula hermonis*, espèce endémique du Liban. Plusieurs études ont été menées sur l'activité œstrogénique et anticancéreuse de la FRT, cependant son activité cytotoxique sur les lignées de cancer œstrogéno-dépendantes n'a pas été élucidée. La FRT est connue pour son effet agoniste vis-à-vis des récepteurs aux œstrogènes α (RE α) et agoniste/antagoniste vis-à-vis des RE β . Dans un premier temps, la production de la FRT a été optimisée par une hémisynthèse à partir de l'hydrolyse basique de l'extrait brut. Son activité anticancéreuse sur des lignées du sein MCF-7 (RE α +, RE β +) et MDA-MB-231 (RE α -, RE β -), de la prostate PC-3 (RE α +, RE β +) et DU 145 (RE α -, RE β +) et 22Rv1 (RE α -, RE β -) et des ovaires OVCAR-3 (RE α +, RE β +) et SKOV-3 (RE α muté, RE β +) et IGROV-1 (RE α -, RE β -) a été testée. Un effet biphasique a été observé sur la prolifération des cellules du carcinome mammaire MCF-7, où son activité proliférative a été corrélée avec la stimulation des REs. La FRT est capable à des concentrations élevées d'inhiber la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses et d'induire un arrêt du cycle cellulaire au niveau de la phase pré G0/G1 agissant ainsi *via* un mécanisme pro-apoptotique. L'efficacité de la férutinine réside dans son pouvoir à cibler spécifiquement les cellules souches/progénitrices cancéreuses chez les lignées cellulaires étudiées qui sont à la base de la réémission tumorale. Cependant, son activité antiproliférative est considérée moyenne puisqu'elle ne peut pas déclencher à des faibles concentrations une activité pure antagoniste des œstrogènes. Les travaux de thèse se sont ensuite focalisés sur la synthèse de composés analogues de la FRT en conservant sa structure indispensable à son activité. Nous avons élaboré un filtre *in silico* de chimiothèques d'antagonistes potentiels des REs. Ce nouvel outil d'arrimage moléculaire a guidé la synthèse des analogues de la FRT en améliorant leur fixation en position antagoniste dans le site de liaison des REs. L'arrimage moléculaire de la férutinine dans le site actif des REs a confirmé structuralement sa double compétence œstrogénique (agoniste/antagoniste) observée *in vitro*. Une douzaine d'analogues de la FRT a été synthétisée et testée pour son pouvoir antiprolifératif sur les lignées cancéreuses considérées. Des résultats prometteurs ont été obtenus notamment pour trois analogues sur les lignées cancéreuses mammaires (**3c'** et **2c'**), prostatiques (**2c'**) et ovariennes (**3b**). Ces composés ont montré une sélectivité vis-à-vis des lignées cancéreuses. Ces analogues constitueront alors des candidats pour une éventuelle plateforme de développement d'agents anticancéreux.

Mots-clés : *Ferula hermonis*, Férutinine, hémisynthèse, cancer hormono-dépendant, récepteurs aux œstrogènes, cellules souches cancéreuses.

Ferutinin and its analogues: hemisynthesis and anticancer activity against hormone-dependent cancer cell lines

Estrogens are key regulators of cell growth in hormone-dependent cancers such as breast, prostate and ovarian. Phyto-estrogens are a diverse group of plant-derived compounds, exhibiting potential benefits for chemoprevention by antagonizing the function of estrogens. Ferutinin (FRT) is the main active phyto-chemical extracted from the endemic plant of Lebanon, *Ferula hermonis*. Several studies were conducted on the estrogenic and anti-proliferative activities of FRT; nevertheless, its cytotoxic activity against estrogen-dependent cancers is not yet elucidated. FRT has been reported as agonist to estrogen receptor α (ER α) and agonist/antagonist to ER β . FRT production was first optimized by hemi-synthesis from basic hydrolysate of crude root extract. The anticancer properties of FRT was assessed against breast (MCF-7, MDA-MB-231), prostate (PC-3, DU 145, 22Rv1) and ovarian (OVCAR-3, SKOV-3, and IGROV-1) cancer cell lines. A biphasic effect was observed on the proliferation of mammary MCF-7 cell line, where the proliferative activity was correlated to ER stimulation. FRT inhibited the proliferation of all studied cell lines at high concentrations and induced a pre G0/G1 cell cycle arrest *via* a pro-apoptotic mechanism of action. FRT targeted the enriched population of cancer stem cells/progenitors which is responsible for tumor reemission. However, its antiproliferative activity is considered weak since it cannot trigger at low concentrations pure estrogen antagonistic activity. This project emphasizes next on the synthesis of FRT analogues by preserving its active structure. We have created an *in silico* filter of chemical compounds that might act as potential antagonists to ERs. This novel molecular docking tool was used to design FRT derivatives by enhancing their antagonist position inside the binding cavity of ERs. Docking results of FRT in the binding site of ERs confirmed structurally the dual potency that exerts this molecule (agonist/antagonist) *in vitro*. A list of FRT analogues were synthesized and tested for their anti-proliferative activity against the studied cell lines. Promising results were obtained with three ferutinin analogues on the proliferation of breast (**3c'** and **2c'**), prostate (**2c'**) and ovarian (**3b**) cancer cell lines. These compounds were also shown to be more selective to cancer cell lines. The cytotoxic properties of these analogues suggest that they could be promoted as potential candidates for useful anticancer therapy.

Key words: *Ferula hermonis*, Ferutinin, hemisynthesis, hormone-dependant cancer, estrogen receptors, cancer stem cells.

Remerciements

Ce travail de recherche et sa rédaction ont été un vrai plaisir en soi, les péripéties qui les ont entourés un peu moins gaies mais néanmoins formatrices.

Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont les compétences, la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase délicate de « l'apprenti-chercheur ».

Jamais assez de remerciements :

A Madame le Professeur Fadia Najjar, pour m'avoir guidée dès mes premiers pas dans la recherche et pour m'avoir encouragée à me lancer dans cette aventure. Je souhaite lui témoigner toute ma gratitude pour son soutien, sa rigueur scientifique et sa grande bienveillance à mon égard. Je garderai de vous le souvenir d'une femme courageuse et humaine.

A Madame le Docteur Evelyne Delfourne, pour m'avoir accueillie dans son équipe. Je t'exprime ma reconnaissance pour l'aide que tu m'as apportée en chimie organique, pour tes conseils, ainsi que pour ta disponibilité.

A Madame le Professeur Mona Diab-Assaf et à son équipe de recherche, je vous remercie pour votre support moral et financier ainsi que pour nos discussions fructueuses et vos conseils pertinents. Soyez assuré de mon estime et mon respect.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Monsieur le Professeur Norbert Bakalara et Madame le docteur Rihab Nasr pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Leur expertise dans ce domaine ainsi que leur jugement apporteront une contribution précieuse à ce travail.

Je remercie aussi Monsieur le Professeur Michel Baltas, directeur du Laboratoire de Synthèse Physico-chimique des Molécules à Intérêt Biologiques SPCMIB, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe PNASM en France avec sympathie. Je suis particulièrement honorée de sa présence dans ce jury de thèse.

Mes remerciements les plus respectueux vont également à Monsieur le Professeur Ramez Chahine et à Madame le Professeur Rania Azar qui m'ont fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être examinateurs. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Eric Benoist à la direction de l'Ecole Doctorale de Sciences de la Matière à Toulouse III. Je vous remercie pour vos conseils, vos encouragements et vos instructions qui ont permis la continuation de cette thèse. Monsieur le Professeur Eric Benoist, veuillez accepter mes plus vifs remerciements pour votre présence dans ce jury et soyez assuré de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

Je remercie l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) pour m'avoir accordé une bourse de thèse et l'association « Azm et Saadé » pour son support continu.

Un grand merci à Monsieur le Docteur Georges Hilal pour m'avoir accueillie dans son laboratoire à l'USJ afin de m'initier à la pratique de la culture cellulaire et pour ses grandes qualités scientifiques et surtout humaines. Je te suis très reconnaissante d'avoir su me remonter le moral dans les moments de doutes, ta confiance en moi, ton optimisme et tes intarissables nouvelles idées. Merci également à tous les membres de l'équipe cancer et métabolisme surtout Layal Wardi, Roula Tahtouh, Ola Atat et Rim Basbous.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur Marwan EL-SABBAN, grâce à qui j'ai pu acquérir la maturation scientifique indispensable au cours de ce projet et pour ses nombreux conseils. Je tiens également à le remercier pour son accueil chaleureux lors de mon séjour dans son laboratoire à l'AUB, ainsi que toute son équipe MES en particulier: Jamal El-Saghir (my nescafé mate), Sara Al-Ghadban (my Ghandi), Tala Kanson (maman de l'adorable Chloé), Farah Kouzi (ma petite), Joyce Azzi (ma plus petite), Jalal Kazan et Sara Jabak. Je n'oublierai jamais nos moments partagés lors de la gloire et de la déception. *'Always remember: if it is meant to be, it will be!'*

Merci à Monsieur le Docteur Wassim Abou Kheir pour ses discussions enrichissantes. Je garderai un très bon souvenir du séjour dans son laboratoire grâce à son amabilité et à celle des membres de son équipe : Rabih Merhabi et Alissan Monzer.

Je souhaiterais aussi adresser ma gratitude à Monsieur le Docteur Frédéric Rodriguez pour son aide précieuse en bioinformatique, ses conseils pratiques et sa gentillesse. En témoignage du temps que tu m'as accordé lors de mes années de thèse pendant lesquelles tu m'as initiée au travail de recherche *in silico* et en souvenir du travail que nous avons réalisé en commun et pour la confiance que tu m'as accordée. Sois assuré, Fred, de mon profond respect et de toute mon amitié. Une pensée à tous les personnels du premier étage au SPCMIB surtout Christian Lherbert, Pascal Hoffman, Cyril Inrad et Christophe Menendez. Vous avez créé une agréable ambiance inoubliable !!!

Mes remerciements vont ensuite à tout le service commun de la RMN, SM et Chantal André (IR). Un remerciement spécial à Monsieur Youssef Diab, Madame Nadine Leygue, Madame Christiane André-Barrès et Monsieur Theodore Tzedakis.

Je n'oublie pas non plus toutes les personnes qui à l'aide de petits conseils et de petits coups de mains ont contribué à l'avancement de ce travail par leur stages respectifs : Rosy Yaghi, Nour Ghazzaoui, Najat Bteich et Joelle Nassar. Je vous souhaite une très bonne continuation ☺

A Lama Y, Raphaël R, Elyse S et Michel N : à tous les moments passés ensemble. A l'accueil chaleureux que vous m'avez fait lors de mon arrivée en France et au soutien que vous m'avez apporté tout au long de ma thèse. Je vous exprime toute mon amitié. Vous êtes un vrai trésor !

Mes remerciements s'adressent à tous mes cousins et mes amis que j'ai, accaparée par mon travail, trop souvent délaissés : Nadine S (ma cousine préférée), Nabil S, José Noel I, Joelle BR, Sandra K, Reine H, Ihsan ES (en souvenir des manipulations de western blots), Rawan EA, Damien V et Lola R (voisine du cappuccino). Un Merci super spécial à Daa N pour son support et son immense patience !!

Toutes mes pensées et mon affection vont à Marie-Josée Lafforgue (Mimi Mature) pour sa présence rassurante et surtout pour ses conseils. Merci d'avoir toujours été à mes côtés.

Toute ma reconnaissance va à mes parents Michel et Ebtissam pour m'avoir permis d'en arriver là et pour m'avoir toujours soutenue même s'ils n'ont pas toujours très bien compris de quoi il retournait. Mille mercis à ma sœur Rachel et à mes frères Elie et Joseph d'avoir été présents durant les moments difficiles et de leur soutien sans faille. Vous avez tous cru en moi et...maintenant j'y suis !!

Merci enfin à toute ma famille, pour ce qu'elle «est».

Merci à tous ceux que je n'ai pas nommés, mais qui m'ont aidée par un sourire, un mot, une attention et souvent plus encore et ont ainsi contribué à la réussite de ce travail.

En tout et pour tout, je remercie qui me guide et qui m'a offert toutes ces bénédictions. Dieu !

*A la mémoire de mes grands-parents,
Youssef et Zahia*

*Poison is in everything,
And nothing is without poison.
The dosage makes it either a poison or a
remedy...*

Paracelsus

Sommaire

Liste des Figures.....	i
Liste des Tableaux.....	v
Liste des Abréviations.....	vii
Introduction générale.....	1
I Etude bibliographique	3
I.1 Cancérogénèse.....	3
I.1.1 Les cellules souches cancéreuses	4
I.1.2 Les cancers hormono-dépendants	6
I.1.3 Les hormones stéroïdes	10
I.1.4 Les récepteurs aux œstrogènes nucléaires : RE α et RE β	16
I.1.5 La signalisation des REs	19
I.1.6 Traitement : l'hormonothérapie.....	20
I.1.7 Effets secondaires et limitations de l'hormonothérapie	24
I.2 Produit naturel comme traitement alternatif : la férutinine	25
I.2.1 Classification botanique de la plante d'intérêt	25
I.2.2 Activités biologiques.....	28
I.2.3 Structure chimique de la férutinine et de composés apparentés.....	35
I.2.4 Relations structures-activités.....	43
II Définition d'un filtre in silico pour la sélection d'antagonistes potentiels des récepteurs aux œstrogènes	51
II.1 Outils et formats de données	53
II.2 Les récepteurs aux œstrogènes nucléaires : RE α et RE β	54
II.2.1 Relations structure-fonction	55
II.3 Analyse structurale	57
II.3.1 Méthodologie	58
II.3.2 Interprétations générales du système.....	73
II.4 Introduction à l'arrimage moléculaire (docking)	77
II.4.1 Le processus d'arrimage	77
II.4.2 Scoring	79
II.4.3 Sélection des poses (efficacité-conformité)	80
II.4.4 Docking 4D	81
II.5 Définition d'un filtre <i>in silico</i>	82
II.5.1 Site de liaison	83
II.5.2 Flexibilité et plasticité	84
II.5.3 Choix des paramètres de calcul	84
II.5.4 Profils pharmacophoriques.....	85
II.5.5 Validation du filtre	87
II.6 Cas de la férutinine.....	91
II.6.1 Cas du RE α	91
II.6.2 Cas du RE β	95
II.7 Conclusions et perspectives	97
III Hémisynthèse et docking des analogues de la férutinine	99
III.1 Analogues de la férutinine.....	100
III.2 Synthèse chimique.....	102
III.2.1 Optimisation de la production de férutinine.....	102
III.2.2 Synthèse de la série d'analogues de la férutinine.....	104
III.3 Application du filtre in silico aux analogues de la férutinine.....	106

III.3.1	Méthodologie d'analyse.....	107
III.3.2	Cas du récepteur RE α	108
III.3.3	Cas du récepteur RE β	116
III.4	Conclusions et perspectives	123
IV	Etude biologique de la férutinine et de ses analogues sur la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses du sein.....	126
IV.1	La férutinine est un inhibiteur potentiel de la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses du sein <i>in vitro</i>	127
IV.2	La férutinine induit une accumulation des cellules au niveau de la phase pré G0/G1 du cycle cellulaire.....	134
IV.3	La férutinine induit la mort cellulaire par apoptose	140
IV.4	La signalisation de la férutinine se fait en partie par le biais des récepteurs aux œstrogènes.....	143
IV.5	La férutinine inhibe la formation des cellules souches/progénitrices dans la lignée MDA-MB-231 alors qu'elle enrichie cette population dans les cellules MCF-7.....	153
IV.6	La férutinine est légèrement sélective vis-à-vis des lignées cellulaires cancéreuses.....	163
IV.7	Les analogues 3c' et 2c' sont des candidats potentiels dans traitement du cancer du sein.....	165
IV.8	Conclusions	169
V	Etude biologique de la férutinine et de ses analogues sur la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses de la prostate et des ovaires	170
V.1	Effet de la férutinine et de ses analogues sur le cancer de la prostate.....	170
V.1.1	La férutinine est un inhibiteur potentiel de la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses de la prostate <i>in vitro</i>	171
V.1.2	La férutinine est relativement sélective vis-à-vis des cellules cancéreuses prostatiques.....	174
V.1.3	La férutinine induit une accumulation des cellules au niveau de la phase pré G0/G1 du cycle cellulaire.....	175
V.1.4	La férutinine retarde la migration et l'invasion cellulaire.....	176
V.1.5	La férutinine cible la population enrichie de cellules souches/progénitrices des cellules cancéreuses prostatiques	180
V.1.6	L'analogue 2c' est le candidat potentiel pour le traitement du cancer prostatique	182
V.2	Effet de la férutinine et de ses analogues sur le cancer des ovaires	183
V.2.1	La férutinine est un inhibiteur potentiel de la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses ovariennes <i>in vitro</i>	184
V.2.2	La férutinine induit une accumulation des cellules au niveau de la phase pré G0/G1 du cycle cellulaire.....	188
V.2.3	La férutinine cible la population des cellules souches/progénitrices dans les cellules cancéreuses ovariennes	189
V.2.4	L'analogue 2b est le candidat potentiel pour le traitement du cancer ovarien.....	193
V.3	Conclusions	194
VI	Conclusion générale et perspectives.....	196
VII	Partie expérimentale.....	199
VIII	Bibliographie.....	221
IX	Annexe-1 : Collection de structures PDB et ligands associés.....	1
<i>Cas des REα</i>		1
<i>Cas des REβ</i>		7
X	Annexe-2 : Paramètres de calcul.....	10

XI	Annexe-3 : Etude biologique de la férutinine	12
XII	Annexe-4 : Etude de quelques régulateurs du cycle cellulaire.....	15

Liste des Figures

Figure 1 : Différentes phases du développement d'un cancer.	4
Figure 2 : Hétérogénéité de la population cellulaire tumorale.	8
Figure 3 : Biosynthèse des hormones stéroïdes.	11
Figure 4 : Classification des œstrogènes.	12
Figure 5 : Cycle de reproduction chez la femme.	13
Figure 6 : Classification des phyto-œstrogènes.	14
Figure 7 : Domaines structuraux des deux récepteurs humains.	17
Figure 8 : Différentes voies de signalisation des œstrogènes.	19
Figure 9 : Distribution géographique du genre <i>Ferula</i> L. du bassin méditerranéen jusqu'à l'Asie centrale.	26
Figure 10 : Plante de <i>Ferula hermonis</i>	27
Figure 11 : Structure d'unité isoprénique.	35
Figure 12 : Structures de daucanes sesquiterpènes isolées de différentes sources.	37
Figure 13 : Quelques structures de daucanes sesquiterpènes isolées du genre <i>Ferula</i> L.	39
Figure 14 : Structures récentes de quelques daucanes sesquiterpènes isolées de <i>Ferula</i> L.	40
Figure 15 : Daucanes esters de <i>F. hermonis</i>	41
Figure 16 : Structure numérotée de la férutinine.	42
Figure 17 : Analogues de la férutinine.	47
Figure 18 : Composés analogues de la férutinine issus de <i>F. hermonis</i>	48
Figure 19 : Composés analogues de la férutinine issus de <i>Ferula</i>	48
Figure 20 : Composés analogues de la férutinine issus de <i>Ferula</i>	49
Figure 21 : Structure commune aux récepteurs nucléaires.	54
Figure 22 : Fixation, dimérisation et translocation du complexe œstrogène-récepteurs dans la cellule.	55
Figure 23 : Structure 1XPC avec un marquage (flèche rouge) de l'hélice H12.	56
Figure 24 : Structuration de type agoniste ou antagoniste des RE α	57
Figure 25 : Alignement structural de différentes chaînes peptidiques du RE α	61
Figure 26 : Surface du site actif de la protéine 3ERT_ renfermant un ligand de grande taille.	62
Figure 27 : Interactions associant la Phe 404.	63
Figure 28 : Structure 3ERT_ : détail des acides aminés à l'entrée du canal.	63
Figure 29 : Exemple de réseaux d'interactions moléculaires.	64
Figure 30 : Alignement des structures 3ERDa, 3ERDb (position agoniste de l'hélice, rose et blanc) et de la structure 3ERT_ (position antagoniste de l'hélice, bleu).	64
Figure 31 : Alignement des trois structures protéiques : agoniste (1GWRa ; EST, vert), antagoniste (3ERT_ ; OHT, blanc) et une structure intermédiaire (1R5Kc ; GW5, rose).	67
Figure 32 : Alignement des ligands résultant de l'alignement des protéines.	68
Figure 33 : Vue du site de liaison des 6 structures canoniques du RE α (incluant les ligands correspondants).	68
Figure 34 : Vue du site de liaison des 5 structures canoniques du RE β (incluant les ligands correspondants).	71
Figure 35 : Organisation du site de liaison des REs.	74
Figure 36 : Ligands dans le site de liaison.	76
Figure 37 : Processus global d'arrimage (docking et scoring).	78
Figure 38 : Les composants du système utilisé dans le calcul.	83
Figure 39 : Profil pharmacophorique utilisé pour le « <i>template docking</i> ».	86

Figure 40 : Interactions de férutinine (FRT) avec les acides aminés dans le site actif du RE α .	91
Figure 41 : Positionnement de férutinine dans les structures canoniques des RE α	94
Figure 42 : Interactions de férutinine avec les acides aminés dans le site actif du RE β .	95
Figure 43 : Positionnement de la férutinine dans les structures canoniques des RE β .	96
Figure 44 : Conservation des conformations de ligands dans les récepteurs RE α/β .	99
Figure 45 : Les analogues de la férutinine synthétisés.	100
Figure 46 : Les acides phénoliques utilisés dans les réactions de synthèse.	101
Figure 47 : Classification des phyto- oestrogènes.	101
Figure 48 : Jaeschkenadiol et esters de daucane abondants dans l'huile de <i>Ferula hermonis</i> .	102
Figure 49 : Schéma réactionnel des analogues de la férutinine.	105
Figure 50 : Exemple de protection : synthèse de l'acide (E)-3-(3,4-diacetoxypheyl) acrylique C ₁₃ H ₁₂ O.	106
Figure 51 : Modes d'arrimage dans la structure 1G50a, incluant le ligand EST (œstradiol, jaune) co-cristallisé.	110
Figure 52 : Représentation visuelle des poses de 3c' (violet) dans les 6 sites canoniques, incluant les ligands co-cristallisés correspondants (EST, EZT, IOG, OHT, AIT, GW5).	115
Figure 53 : Modes d'arrimage dans la structure U3Sa, incluant le ligand 797 (violet) co-cristallisé.	117
Figure 54 : Modes d'arrimage dans la structure 2IOJc, incluant le ligand IOG (rose) co-cristallisé.	119
Figure 55 : Modes d'arrimage dans la structure 2IOJc, incluant le ligand IOG (rose) co-cristallisé.	121
Figure 56 : Modes d'arrimage dans la structure 1X7R ₂ , incluant le ligand GEN (saumon) co-cristallisé.	122
Figure 57 : Composés retenus à l'issue de l'application du filtre <i>in silico</i> .	123
Figure 58 : Viabilité cellulaire de la lignée MCF-7 suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après (A) 24 h, (B) 48 h et (C) 72 h (A, B et C sont les résultats d'expériences représentatives).	129
Figure 59 : Viabilité cellulaire de la lignée MDA-MB-231 suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après (A) 24 h, (B) 48 h et (C) 72 h (A, B et C sont les résultats d'expériences représentatives).	130
Figure 60 : Observation en microscopie optique des cellules cancéreuses du sein MCF-7 (A, B et C) et MDA-MB-231 (D, E et F) après traitement par la férutinine.	131
Figure 61 : Prolifération cellulaire de la lignée MCF-7 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après 24 h, 48 h et 72 h.	132
Figure 62 : Prolifération cellulaire de la lignée MDA-MB-231 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après 24 h, 48 h et 72 h.	132
Figure 63 : Prolifération cellulaire de la lignée MCF-7 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après 72 h dans un milieu jaune CSS.	133
Figure 64 : Les différentes phases du cycle cellulaire	134
Figure 65 : Représentation du nombre de cellules MCF-7 en fonction de la quantité d'ADN suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations pendant 24 h, 48 h et 72 h.	135
Figure 66 : Analyse de la progression dans le cycle cellulaire des cellules MCF-7 après traitement par la férutinine.	136
Figure 67 : Cycle cellulaire de la lignée MCF-7 après traitement par 30 μ M de férutinine pendant 24 h (rouge), 48 h (bleu) et 72 h (vert).	137

Figure 68: Représentation du nombre de cellules MDA-MB-231 en fonction de la quantité d'ADN suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations pendant 24 h, 48 h et 72 h.....	138
Figure 69: Analyse de la progression dans le cycle cellulaire des cellules MDA-MB-231 après traitement par la férutinine.....	139
Figure 70 : Marquage par DAPI des cellules MCF-7 suite au traitement par la férutinine..	141
Figure 71 : Marquage par DAPI des cellules MDA-MB-231 suite au traitement par la férutinine.....	142
Figure 72 : Marquage par DAPI des cellules MDA-MB-231 suite au traitement par 30 μ M déférutinine.....	142
Figure 73 : Analyse de l'expression des RE α / β phosphorylés dans le cas de la lignée MCF-7 par « western blot » en fonction de la concentration en férutinine administrée.....	145
Figure 74 : Analyse de l'expression des RE α / β phosphorylés dans le cas de la lignée MCF-7 par « western blot » en fonction de la concentration en férutinine + 1 nM E2.....	147
Figure 75 : Analyse de l'expression des RE β phosphorylés de la lignée MDA-MB-231 par « western blot » en fonction de la concentration en férutinine.	148
Figure 76 : Marquage par immunofluorescence des cellules MCF-7.....	149
Figure 77: Marquage par immunofluorescence des cellules MCF-7.....	150
Figure 78: Marquage par immunofluorescence des cellules MCF-7.....	151
Figure 79 : Unité de formation des sphères des cellules dérivées de la lignée MCF-7 et MDA-MB-231 exprimée en pourcentage de l'UFS.....	155
Figure 80 : Taille des sphères des cellules cancéreuses dérivées de la lignée MCF-7 après 2 et 10 jours, de traitement par la férutinine..	156
Figure 81 : Surface des sphères dérivées de la lignée cellulaire MDA-MB-231 après 2 et 10 jours de traitement par la férutinine.	157
Figure 82 : Variation de la population CD44 ^{fort} /CD24 ^{faible} exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine.....	158
Figure 83 : Schéma de la propagation des cellules MCF-7. Les valeurs de l'UFS figurent à chaque étape.....	159
Figure 84 : Schéma de la propagation des cellules MDA-MB-231. Les valeurs de l'UFS figurent à chaque étape.....	160
Figure 85 : Schéma de la propagation des cellules MCF-7 suite à un prétraitement par la férutinine pour 48 h et 72 h.	160
Figure 86: Nombre de sphères des cellules MCF-7 de la première génération suite au prétraitement par la férutinine.....	161
Figure 87 : Schéma de la propagation des cellules MDA-MB-231 suite à un prétraitement par la férutinine pour 48 h et 72 h.	162
Figure 88 : Nombre de sphères des cellules MDA-MB-231 de la première génération suite au prétraitement par la férutinine	162
Figure 89 : Viabilité (à gauche) et prolifération (à droite) cellulaire de la lignée MCF-10A exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après 24 h, 48 h et 72 h.	164
Figure 90 : Viabilité cellulaire de la lignée HAEC suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après (A) 24 h, (B) 48 h et (C) 72 h (A, B et C sont les résultats d'expériences représentatives).	165
Figure 91 : Viabilité cellulaire des lignées cellulaires prostatiques suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après 24 h, 48 h et 72 h.....	172
Figure 92 : Prolifération cellulaire des lignées (A) PC-3, (B) DU 145 et (C) 22Rv1 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après 24 h, 48 h et 72 h.....	173

Figure 93 : Viabilité cellulaire de la lignée RWPE-1 suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après (A) 24 h, (B) 48 h et (C) 72 h.....	174
Figure 94 : Analyse de la progression du cycle cellulaire des cellules PC-3 traitées par la férutinine à différentes concentrations.	175
Figure 95 : Test de la chambre de Boyden : effet de la férutinine sur l'invasion cellulaire de la lignée PC-3.....	177
Figure 96 : Effet de la férutinine sur l'invasion cellulaire par le test de la cicatrice dans le cas de la lignée cellulaire PC-3	179
Figure 97 : Inhibition de la prolifération et de la taille des sphères traitées par la férutinine chez la lignée PC-3.....	180
Figure 98 : Représentation des sphères obtenues à partir de la lignée PC-3.....	181
Figure 99 : Inhibition de la prolifération et de la taille des sphères traitées par la férutinine dans la lignée DU 145	181
Figure 100 : Représentation des sphères obtenues à partir de la lignée DU 145.	182
Figure 101 : Viabilité cellulaire de la lignée OVCAR-3 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations pour (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72 h et (D) 96 h	185
Figure 102 : Viabilité cellulaire de la lignée SKOV-1 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations pour (A) 24 h, (B) 48 h et (C) 72 h.....	186
Figure 103 : Viabilité cellulaire de la lignée IGROV-1 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations pour (A) 24 h, (B) 48 h et (C) 72 h.....	187
Figure 104 : Prolifération cellulaire des lignées (A) OVCAR-3 et (B) IGROV-1 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations pour 24 h, 48 h et 72 h (96 h pour OVCAR-3).....	188
Figure 105 : Analyse de la progression du cycle cellulaire des lignées cellulaire ovariennes traitées par la férutinine à différentes concentrations (A, C et E).....	189
Figure 106 : Taille des sphères dérivées de la lignée cancéreuse ovarienne SKOV-3 suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations.	190
Figure 107 : Taille des sphères dérivées de la lignée cellulaire OVCAR-3 suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations	191
Figure 108 : Taille des sphères dérivées de la lignée ovarienne IGROV-1 suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations..	192

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification des fonctions des différents domaines des REs.....	18
Tableau 2 : Rôles physiologiques et pathologiques des REs dans les tissus.....	19
Tableau 3 : Activités biologiques des ligands des récepteurs aux œstrogènes dans leurs tissus cibles.....	22
Tableau 4 : Activités antibactériennes de la férutinine.	30
Tableau 5 : Activité cytotoxique de la férutinine sur les cellules MCF-7.....	33
Tableau 6 : Activité cytotoxique de la férutinine sur les cellules MCF-7.....	33
Tableau 7 : Activité cytotoxique de la férutinine sur les cellules MCF-7.....	34
Tableau 8 : Cytotoxicité de la férutinine sur les différentes lignées cellulaires œstrogène-indépendantes.	35
Tableau 9 : La férutinine dans les différentes espèces de <i>Ferula</i>	41
Tableau 10 : Analogues de la férutinine.....	44
Tableau 11 : Analogues de la férutinine.....	45
Tableau 12 : Activités cytotoxiques de la férutinine et ses analogues sur les différentes lignées cellulaires.	49
Tableau 13 : Acronymes (colonne Format) des principaux formats de fichiers utilisés.....	53
Tableau 14 : Les familles et structures canoniques du RE α	69
Tableau 15 : Familles et structures canoniques du RE β (mêmes conventions que dans le cas des RE α).	72
Tableau 16 : Reproduction de la cristallographie des ligands des structures canoniques du RE α	89
Tableau 17 : Reproduction de la cristallographie des ligands des structures canoniques du RE β	90
Tableau 18 : Résultats d'arrimage moléculaire de FRT dans le RE α	92
Tableau 19 : Résultats d'arrimage moléculaire de FRT dans le RE β	95
Tableau 20 : Rendements pour les composés de la ligandothèque.	106
Tableau 21 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 1G50a.	109
Tableau 22 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 1XPC_.....	111
Tableau 23 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 2IOG_.....	111
Tableau 24 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 2P15bR.....	112
Tableau 25 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 1R5KaR.....	112
Tableau 26 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 3ERT_.....	113
Tableau 27 : Résultats d'arrimage des analogues sélectionnés de la férutinine dans le récepteur RE α	114
Tableau 28 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 1QKN_.....	116
Tableau 29 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 1U3Sa.....	117

Tableau 30 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 1X7R_	118
Tableau 31 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 2IOJc.	118
Tableau 32 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 2YJA_	119
Tableau 33 : Résultats d'arrimage des analogues de la férutinine dans le cas du récepteur REβ.	120
Tableau 34 : Valeurs de CI ₅₀ des analogues hémi-synthétiques sur les lignées cellulaires cancéreuses du sein (MCF-7 et MDA-MB-231), sur la lignée contrôle du sein (MCF-10A) et sur la lignée normale aortique endothéliale (HAEC)..	166
Tableau 35 : Les caractéristiques des différentes lignées cellulaires prostatiques utilisées dans l'étude.	171
Tableau 36 : Valeurs des CI ₅₀ d'analogues hémi-synthétiques de la férutinine sur deux lignées cellulaires de la prostate PC-3 et DU-145.	183
Tableau 37 : Les caractéristiques des différentes lignées cellulaires ovariennes utilisées dans notre étude.	184
Tableau 38 : Valeurs des CI ₅₀ des trois produits synthétisés sur les trois lignées cellulaires cancéreuses ovariennes.	193
Tableau 39 : Anticorps utilisés dans l'étude.	217

Liste des abréviations

2D :	Deux Dimension
3D :	Trois Dimension
Å :	Angstrom
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
AF :	Activation Function
AKT :	Protein kinase B
Ala :	Alanine
ALDH :	Aldehyde déhydrogénase
AP1 :	Activator Protein 1
APC :	Allophycocyanin
ARA70 :	Associated Protein 70
ARE :	Androgen Response Element
Arg :	Arginine
ARNm :	Acide Ribonucléique messenger
ASC II :	American Standard Code for Information Interchange
A-T :	Adénine-Thymine
ATCC :	American Type Culture Collection
ATP :	Adenosine Triphosphate
Bcl-2 :	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL :	B-cell lymphoma-extra large
CBP :	Conformity Best Pose
CD :	Cluster of Differentiation
CI ₅₀ :	Concentration inhibitrice de 50%
CMI :	concentration Minimale Inhibitrice
CoA :	Coenzyme A
CPC :	Conformity Pose Count
CSC :	Cellule Souche Cancéreuse
CSS :	Charcoal Striped Serum
CTL :	Contrôle
CUDA :	Compte Unified Device Architecture
DAPI :	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorate
DBD :	DNA Binding Domain
DCC :	N, N'-Dicyclohexylcarbodiimide
DES :	Diethylstilbestrol
DHT :	Dihydrotestosterone
DMAP :	4-Dimethylaminopyridine
DMSO :	Dimethyl sulfoxide
DPPH :	2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl
E :	Énergie
E1 :	Estrone
E2, EST :	Œstradiol
E3 :	Estriol
EC ₅₀ :	Dose effective
EE2 :	Ethinyl Estradiol
EGF :	Epidermal Growth Factor

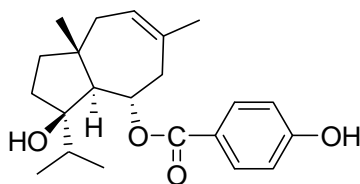
ELISA :	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERE :	Estrogen Response Element
ERK :	Extracellular signal Regulated Kinase
ESR :	Gène des récepteurs aux œstrogènes
Facs :	Fluorescence-activated cell sorter
FITC :	Fluorescein isothiocyanate
FKBP52 :	FK506-Binding Protein
FRT :	Férutinine
FSC :	Forward Scatter
FSH :	Hormone Folliculo-Stimulante
G :	Génération
GEN :	Génistéine
Glu :	Glutamine
Gly :	Glycine
GnRH :	Gonadotropin-Releasing Hormone
GPU :	Graphics Prossessing Unit
GTH :	Gonadotrophines
H&E :	Hématoxyline et Eosine
H12 :	Hélice 12
HAEC :	Human Aortique Endothelial Cell
HC :	Hetero Compound
HCl :	Acide Chloridrique
HGPIN :	High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia
His :	Histidine
HR :	Région Charnière
hRE:	Récepteurs aux œstrogènes humain
HRP :	peroxydase du raifort
Hsp90 :	Heat Shock Protein 90
Ile :	isoleucine
IP :	Iodure de Propidium
K _d :	Constante de dissociation
KDa :	Kilo Dalton
KO :	Knock Out
LBD :	Ligand Binding Domain
LC ₅₀ :	Concentration Létale
Leu :	Leucine
LH :	Hormone Lutéinisante
LH-RH:	Luteinizing Hormone-Releasing Hormone
Lys :	Lysine
MAPK :	Mitogen Activated Protein Kinase
MDR :	Multi Drug Resistance
Met :	Méthionine
MMP :	Metalloprotéinase
MTT :	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
MVD :	Molegro Virtual Docker
NADH :	Nicotinamide adenine dinucleotide
NLS :	Nuclear Localization site
NTD :	Domaine N-Terminal
OHT :	4-Hydroxytamoxifène
OpenBabel :	Open source chemistry toolbox

PARP :	Poly ADP-Ribose polymérase
PDB :	Protein Data Bank
PDE5A1 :	Phosphodiesterase-5A1
PE :	Phyto-œstrogènes
Phe :	Phenylalanine
PI3K :	Phosphoinositide-3-Kinase
PKC :	Phospho Kinase C
Pro :	Proline
PVDF :	Polyvinylidene fluoride
RA :	Récepteurs aux androgènes
RAL :	Raloxifène
RE :	Récepteurs aux œstrogènes
RMN :	Résonnance Magnétique Nucléaire
RMSD :	Root Mean Square Deviation
RP :	Récepteurs aux Progestérones
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute
SciTE :	Scintilla Text Editor
SDS-PAGE :	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
Ser :	Sérine
SERM :	Selective Estrogen Receptor Modulator
SP1 :	Specificity Protein 1
SSC :	Side Scatter
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
TEM :	Transition Epithéliale-Mésenchymateuse
TFF1 :	Trefoil Factor 1
Thr :	Thréonine
THS :	Traitement Hormonal Substitutif
Trp :	Tryptophane
TSH :	Thyroid Stimulating Hormone
UFS :	Unité de formation des sphères
USCF :	University of California San Francisco
UV :	Ultra Violet
VEGF :	Vascular Endothelium Growth Factor
ΔG :	Énergie d'activation

Introduction générale

La croissance tumorale dans les cancers hormono-dépendants est stimulée par l'action des œstrogènes. Des traitements adjuvants avec des anti-œstrogènes, tel que le tamoxifène, peuvent améliorer la survie des patients. Néanmoins, le bénéfice de l'hormonothérapie se heurte au développement de la résistance intrinsèque ou acquise des tumeurs. D'où se présente l'intérêt d'une recherche continue de nouvelles solutions thérapeutiques.

Parmi les molécules isolées de *Ferula hermonis*, espèce endémique du Liban, la férutinine suscite un grand intérêt.



Notre laboratoire a été le premier en 2001, à purifier et à identifier ce composé extrait à partir des racines de cette plante. La férutinine est un sesquiterpène possédant une fonction phyto-œstrogénique, capable d'interférer avec les effets mitogènes de l'œstrogène. Les recherches se sont accrues au cours de ces dernières années sur l'implication de la férutinine dans la prévention du cancer. Elle s'est avérée active sur l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses hormono-indépendantes et -dépendantes. Toutefois, les études menées sur l'activité biologique de la férutinine vis-à-vis des lignées hormono-dépendantes, restent préliminaires. Les enjeux de ce travail de thèse se focalisent sur l'effet antiprolifératif de la férutinine envers des lignées cellulaires cancéreuses de sein, de prostate et d'ovaires hormono-dépendantes et -indépendantes. Dans le but d'améliorer l'activité anti-cancéreuse de la férutinine, une liste de composés d'analogues a été conçue en se basant sur des études d'arrimage moléculaire et ensuite héli-synthétisée. Leur effet antiprolifératif a été ultérieurement évalué sur les différentes lignées cellulaires cancéreuses.

Ce manuscrit comprend cinq parties :

- Dans la première partie du premier chapitre sont décrit brièvement : les cellules souches cancéreuses ; les trois types de cancers hormono-dépendants sujet de l'étude (les cancers du sein, de l'ovaire et de la prostate) ; le rôle des œstrogènes dans l'étiologie, la prévention, le traitement et dans la pathogénèse de ces cancers ; les récepteurs aux œstrogènes et les voies de signalisations qui passent par l'activité de ces derniers ; l'hormonothérapie et ses effets secondaires. Dans la deuxième partie de ce chapitre sont exposés : la structure chimique de la férutinine et des sesquiterpènes

apparantés ; l'implication des phyto-œstrogènes et de la férutinine dans les diverses fonctions biologiques ; l'activité anticancéreuse de la férutinine sur les différentes lignées cellulaires cancéreuses.

- Dans le deuxième chapitre est traitée l'étude *in silico* des interactions de la férutinine vis-à-vis des récepteurs aux oestrogènes pour permettre à terme d'optimiser le pouvoir antagoniste de ligands potentiels. Une étude structurale complète des récepteurs RE α et RE β appréhendant leur site de liaison et une étude d'arrimage moléculaire avec mise au point d'un système de filtrage postdocking adapté est décrite.
- Dans le troisième chapitre est décrit l'hémisynthèse des différents analogues de la férutinine qui sont obtenus à partir du jaeschkeanadiol naturel. Ce dernier est obtenu par hydrolyse basique de l'huile brute extraite des racines de *Ferula. hermonis*. Les analogues sont obtenus par estérification du jaechkeanadiol avec différents acides, puis dockés en utilisant les systèmes de filtrage décrit dans le chapitre précédent.
- Dans les chapitres 4 et 5 sont exposées les réponses cellulaires des lignées de différents cancers du sein MCF-7 (RE α +, RE β +) et MDA-MB-231(RE α -, RE β -), de la prostate PC-3 (RE α +, RE β), DU 145 (RE α -, RE β +) et 22Rv1 (RE α -, RE β -) et de l'ovaire OVCAR-3 (RE α +, RE β), SKOV-3 (RE α muté, RE β +) et IGROV-1 (RE α -, RE β -) après traitement par la férutinine et ses analogues. La férutinine est testée pour son effet sur la prolifération, le cycle cellulaire, l'apoptose et la formation des cellules souches dans le cas des cancers de sein MCF-7 (RE α +, RE β +) et MDA-MB-231(RE α -, RE β -).

Le mécanisme d'action exercé par la férutinine sur MCF-7 est évalué et l'implication des REs est vérifiée par l'étude de leur niveau d'expression par « Western Blot » et par immunofluorescence. Une relation claire entre l'implication des REs (effet agoniste/antagoniste de la férutinine) et la réponse cellulaire (prolifération/antiprolifération) est établie. L'influence du traitement par la férutinine sur les cellules souches cancéreuses de différentes lignées cellulaires est de même représentée.

I Etude bibliographique

I.1 Cancérogénèse

Le cancer est un terme générique, utilisé pour décrire une pathologie caractérisée par la présence d'une ou plusieurs tumeur(s) maligne(s), résultant d'un dérèglement de la prolifération cellulaire et de la suppression de la mort cellulaire programmée, l'apoptose. Le cancer pouvant survenir dans tous les tissus, il en existe un très grand nombre.

Le passage de la cellule normale à la cellule cancéreuse, processus appelé transformation, correspond à l'acquisition de propriétés caractéristiques : prolifération incontrôlée, indépendance vis-à-vis des signaux stimulant la prolifération et insensibilité aux signaux inhibiteurs, abolition de l'apoptose, acquisition d'un pouvoir invasif, capacité à l'angiogénèse, instabilité génomique, etc.

Différents agents conduisent au développement d'un cancer. Classiquement, on distingue les agents initiateurs et les agents promoteurs. Les agents initiateurs sont des agents génotoxiques qui induisent un endommagement génétique, causé par des agents chimiques (carcinogènes), des radiations ionisantes (rayons α , β , γ et X) et non ionisantes (ex : UV-B), des virus (ex : *papillomavirus*) ou des molécules issues du métabolisme même de la cellule. Par contre, les agents promoteurs n'induisent pas de lésions de l'acide désoxyribonucléique (ADN) mais favorisent l'expression d'une lésion, préalablement induite par un agent initiateur. Ces deux agents constituent les deux premières phases du développement d'un cancer.

La troisième phase du développement d'un cancer est la progression tumorale. Durant cette étape, la tumeur acquiert un caractère malin. Un apport en énergie devient indispensable pour que la tumeur continue de s'accroître. Elle élabore donc un stratagème très efficace en sécrétant des signaux chimiques, tel que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF, *Vascular Endothelium Growth Factor*), afin de détourner les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins voisins. La finalité de ce processus, appelé angiogénèse, est la formation d'un réseau de capillaires au sein de la tumeur. Cette dernière possède alors la capacité d'envahir d'autres organes ou tissus et donc de former des métastases (Folkman J, 1971) (Figure 1).

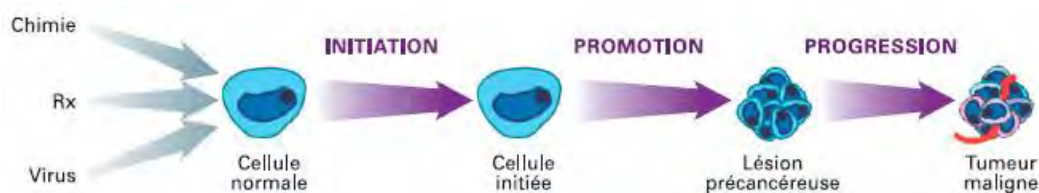


Figure 1 : Différentes phases du développement d'un cancer¹.

Depuis quelques années, le concept de l'origine du cancer au niveau des cellules souches émerge (Lobo NA *et al.*, 2007). Les agents carcinogènes ou les molécules issues du métabolisme cellulaire peuvent générer des lésions de l'ADN ou des problèmes de division de la cellule. Les cellules souches « pré-cancéreuses » deviennent alors génétiquement instables. Par évolution clonale, ces cellules deviennent des « cellules cancéreuses » qui forment des tumeurs et en assurent le renouvellement.

I.1.1 Les cellules souches cancéreuses

Les thérapies classiques (chimiothérapie et radiothérapie) ciblent le plus grand nombre possible de cellules cancéreuses en division jusqu'à la disparition de la masse tumorale. Ces thérapies permettent d'éliminer la plupart des cellules différenciées mais ne touchent pas la sous-population cellulaire en dehors du cycle, en phase de quiescence. En dépit de la destruction des cellules cancéreuses, cette sous-population est responsable de la récurrence du cancer. Au sein de la tumeur, cette population est la source de l'hétérogénéité fonctionnelle. L'existence de cette hétérogénéité a conduit à la création d'au moins deux modèles : les cellules souches cancéreuses (CSC) et la théorie de l'évolution clonale (Lobo NA *et al.*, 2007).

Les cellules souches normales adultes ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en différents types cellulaires et présentent un potentiel de prolifération élevé. Elles se divisent rarement et restent en phase de quiescence et indifférenciées.

Les cellules souches cancéreuses sont des cellules qui cumulent deux identités : ce sont à la fois des cellules cancéreuses et des cellules souches. Elles partagent plusieurs caractéristiques avec les cellules souches normales. En effet, elles ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier. Les CSCs ont la faculté de se diviser de façon asymétrique pour donner naissance à une nouvelle cellule souche cancéreuse identique à la cellule mère et

¹ [http : //www.sante-environnement-travail.fr/minisite.php3?id_rubrique=868&id_article=2678](http://www.sante-environnement-travail.fr/minisite.php3?id_rubrique=868&id_article=2678), Centre François Baclesse, Centre de lutte contre le cancer de Basse-Normandie.

de générer des progéniteurs cellulaires, qui eux-mêmes, seront à l'origine des lignées cellulaires différenciées. Les cellules filles vont ensuite proliférer et former la masse tumorale.

Les CSCs se situent dans un microenvironnement cellulaire complexe, appelé «niche». Cette niche est vascularisée et composée de cellules stromales telles que des myofibroblastes, des cellules immunitaires, des cellules mésenchymateuses, des molécules de la matrice extracellulaire ainsi que des cellules nerveuses. Selon leur microenvironnement, les CSC possèdent des caractéristiques et expriment des molécules spécifiques permettant leur isolement.

Dans le cancer du sein, les cellules souches ont été caractérisées par des marqueurs cellulaires, la présence de CD44 et l'absence de CD24. Bien que la fonction de ces marqueurs dans ce contexte ne soit pas claire, la xénogreffe de ces cellules CD44⁺/CD24^{-/faible} chez la souris possède une capacité tumorale 10 à 50 fois supérieures à la xénogreffe d'une autre tumeur (Kai K *et al.*, 2010). Les deux marqueurs de surfaces CD24 et CD44 sont exprimées par les cellules différenciées et « progénitrice-like », respectivement (Fillimore C et Kuperwasser C, 2007). La surexpression de l'enzyme ALDH⁺ (aldéhyde déshydrogénase) est corrélée avec une diminution de la survie des patients. La quantification de l'expression de ces trois protéines pourrait servir comme un meilleur marqueur de pronostic pour ce cancer (Velasco-Velazquez MA *et al.*, 2012). Dans le cancer de la prostate, une fraction de la population épithéliale (approximativement 1 %) exprime les marqueurs CD133⁺ et $\alpha 2\beta 1$ intégrine. Le phénotype $\alpha 2\beta 1^{\text{élevé}}$ /CD133⁺/CD44⁺ confère aux cellules un grand potentiel prolifératif et une habilité à reconstruire des acini « prostatique-like » dans des souris mâles immunodéficientes (Collins AT *et al.*, 2005). Dans le cancer des ovaires, l'isolement des CSC dans l'ovaire se fait suite à l'identification des marqueurs CD117 (c-kit) et CD44. D'autres marqueurs sont communs au cancer du sein, ce sont l'ALDH et le CD133. La carcinogénèse ovarienne étant toujours actuellement débattue, l'origine de ce cancer se traduit par une multiplication des marqueurs proposés pour identifier une CSC ovarienne. Il n'existe actuellement pas de consensus concernant les marqueurs à utiliser (Zhang S *et al.*, 2008).

Les cellules souches adultes peuvent être étudiées en utilisant leur capacité à générer des sphères. Cette capacité est utilisée pour enrichir les populations de cellules souches normales ou pour caractériser les cellules souches tumorales. La compréhension des processus de résistances de ces cellules est primordiale pour essayer de trouver une thérapie ciblée plus

efficace que celle utilisée à l'heure actuelle. L'élimination ciblée des CSC devrait assurer une guérison à long terme.

I.1.2 Les cancers hormono-dépendants

Certains tissus (tels que la glande mammaire, l'endomètre, la prostate et les ovaires) sont particulièrement sensibles aux effets des hormones sur la survie, la croissance ou la différenciation cellulaire. Les cancers dérivés de ces tissus peuvent garder tout ou partie de cette « hormono-dépendance ».

Les hormones en cause dans les cancers hormono-dépendants sont essentiellement des stéroïdes (œstrogènes, androgènes), plus rarement des hormones polypeptidiques (hormone de stimulation thyroïdienne TSH, somatostatine). Ces cancers expriment des récepteurs hormonaux qui peuvent rester fonctionnels et sont détectables par des techniques immuno-histochimiques permettant une évaluation semi-quantitative de leur degré d'expression, ou dosables par des techniques biochimiques. Leur présence et leur niveau d'expression sont des paramètres importants de prédiction de la réponse à un traitement hormonal. Par exemple, dans les cancers hormono-dépendants du sein et de l'ovaire (ou de la prostate), la survie et la prolifération cellulaire sont soutenues par les œstrogènes (ou respectivement par les androgènes) ; la privation de cette influence hormonale peut inhiber la prolifération et/ou entraîner la mort des cellules cancéreuses et permettre des effets anti-tumoraux durables (Henderson BE et Feigelson HS, 2000).

I.1.2.1 Le cancer du sein

Le cancer du sein est une tumeur maligne de la glande mammaire. C'est le plus fréquent des cancers féminins. De nombreux facteurs peuvent être impliqués dans le déclenchement de ce cancer, parmi lesquels le sexe, l'âge, la durée de la vie génitale, la nulliparité, la première grossesse après 30 ans, l'histoire familiale, l'antécédent personnel de cancer du sein, les facteurs hormonaux et les facteurs environnementaux. Parmi ces facteurs, on détaillera seulement l'implication du facteur hormonal dans la cancérogenèse du sein.

Une observation directe de la prise d'œstrogène chez la femme post ménopausée augmente le risque de cancer du sein. Ainsi, le traitement hormonal de substitution (THS) augmente ce risque d'une manière significative (risque relatif estimé à 1,5) (Claus EB *et al.*, 2003).

D'autre part, des études *in vitro* supportent l'action carcinogène des œstrogènes sur les cellules mammaires. En effet, des cellules épithéliales humaines du sein, MCF-10F, traitées avec l'œstradiol (E2), forment des colonies au bout de 21 jours. L'E2 provoque de nombreuses modifications cellulaires dont une croissance indépendante de la fixation des cellules au support, une absence de canulogénèse dans le collagène et une invasion cellulaire du matrigel. L'induction de la transformation complète des cellules MCF-10F confirme la carcinogénèse d'E2 et montre que cette hormone peut être à l'origine de cancer du sein chez les femmes (Russo J *et al.*, 2006).

Les tumeurs du sein peuvent se différencier par la présence ou l'absence de récepteurs aux œstrogènes (RE+/-) et de la progestérone (RP+/-). Les tumeurs RE+/RP+ représentent les tumeurs les plus communes. La présence de ces récepteurs est dépendante de nombreux facteurs, ainsi, le nombre de tumeurs contenant les récepteurs aux œstrogènes varie avec l'âge et l'utilisation d'hormone après la ménopause alors que la présence du récepteur de la progestérone varie avec le poids corporel et l'historique de la grossesse (Colditz G et Rosner B, 2004).

Les deux isotypes de REs sont co-exprimés dans le tissu mammaire. En effet, le récepteur RE α est exprimé dans les tumeurs malignes augmentant leur division cellulaire tandis que la présence de RE β peut compléter ou s'opposer à l'effet de RE α (Palmieri C *et al.*, 2002). Le niveau d'expression de RE α est associé à un pronostic favorable du cancer (tumeurs différenciées) et, malgré le rôle contradictoire de RE β , les études menées sur son niveau d'expression suggèrent qu'il est aussi un indicateur de pronostic favorable (Herynk MH et Fuqua SA, 2004).

I.1.2.2 Le cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme. Il se développe à partir de cellules épithéliales prostatiques, son évolution est lente et implique plusieurs étapes. Grâce au progrès de la détection, le diagnostic est fait aujourd'hui de façon plus précoce que dans le passé. Le cancer de la prostate a une population cellulaire hétérogène (Figure 2) où la composition cellulaire de la tumeur devient de plus en plus indifférenciée et hétérogène au fil des doublements successifs ouvrant le champ à des mutations génétiques.

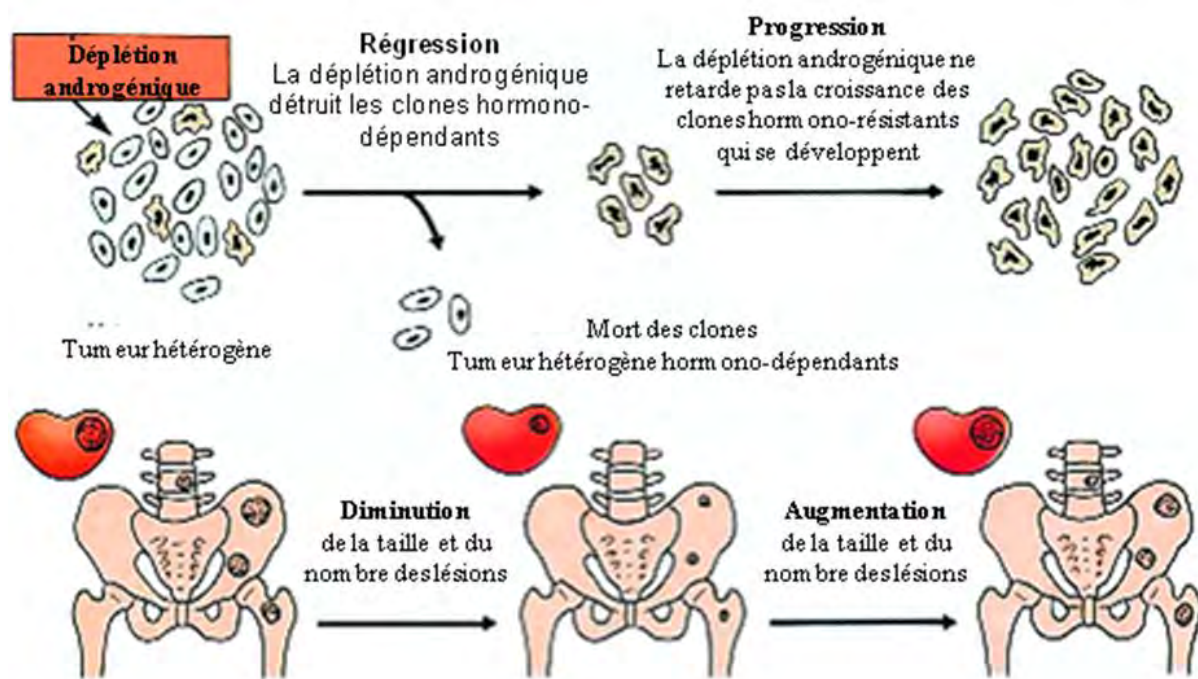


Figure 2 : Hétérogénéité de la population cellulaire tumorale².

La prostate est considérée essentiellement comme un organe androgéno-dépendant, contrôlée avant tout par les niveaux de testostérone dans le plasma. La prostate adulte normale fonctionne à l'intérieur d'un « environnement multi-hormonal » et répond à une variété de facteurs de régulateurs de la croissance. La tumeur peut passer d'un stade hormono-dépendant à un autre hormono-indépendant.

Une tumeur devient hormono-indépendante lorsqu'après une période plus ou moins longue de réponse, la progression reprend malgré la poursuite d'un traitement hormonal bien conduit. L'hormono-indépendance a été classiquement expliquée par une diminution de la densité des récepteurs aux androgènes (RA) dans les cellules prostatiques les rendant ainsi imperméables aux androgènes au cours de l'évolution tumorale. Les études récentes qui utilisent des anticorps monoclonaux dans l'identification des RA n'ont pas confirmé cette hypothèse. Ils ont montré que non seulement les RA sont présents à tous les stades de développement du cancer mais qu'ils ont tendance à être surexprimés dans les récidives et les métastases et continuent de ce fait à jouer un rôle actif dans la maladie avancée. La cellule hormono-indépendante est en fait une cellule hypersensible aux androgènes permettant à la cellule de continuer à se développer dans un milieu pauvre en androgènes (Craft N *et al.*, 1999).

² <http://urofrance.org/fileadmin/documents/data/PU/2002/PU-2002-12020007/TEXF-PU-2002-12020007.PDF>.
Saad Khoury, hôpital de la Pitié, service urologie, Paris.

D'autres hormones sont impliquées, mais à moindre degré, dans la cancérogenèse prostatique, ce sont les œstrogènes. Ces œstrogènes sont connus pour leur rôle dans le développement et la progression du cancer de la prostate. En effet, la prostate est équipée d'un système dual de récepteurs aux œstrogènes (RE α et RE β) qui subissent un remodelage durant la progression du cancer. Les fonctions biologiques précises des deux types de REs dans la prostate sont actuellement inconnues. Plusieurs études ont décrit l'expression des récepteurs ainsi que les niveaux d'acide ribonucléique messager (ARNm) et de protéine dans les compartiments épithéliaux et stromals de la prostate normale ou maligne d'hommes adultes.

Le RE β est localisé principalement dans le compartiment basal des cellules épithéliales de la prostate humaine normale, où RE α est rarement retrouvé, mais exprimé en abondance dans le stroma de la glande normale. Toutefois, d'une façon générale, il y a une prédominance surtout du RE β dans la prostate (Harkonen PL et Makela SI, 2004). En revanche, le niveau d'expression de ces deux types de récepteurs dans le cancer de la prostate reste très faible en comparaison avec le cancer du sein (Harkonen PL et Makel SI, 2004).

Les études montrent que le RE α est un proto-oncogène qui est surexprimé dans la transformation maligne de l'épithélium prostatique tandis que le RE β est un suppresseur de tumeur où son expression est diminuée dans 40 % des cas de ce type de cancer. Par exemple, dans la néoplasie intra-épithéliale prostatique haut grade (HGPIN, *high-grade prostatic intraepithelial neoplasia*), le RE α surexprimé est à la base des effets carcinogènes de l'œstradiol. En outre, durant la transformation maligne, la surexpression de RE α s'étend des cellules basales aux cellules luminales où les changements dysplasiques auront place. Par contre, dans le HGPIN le taux de RE β est diminué ce qui explique son rôle protecteur (Bonkhoff H et Berges R, 2009).

I.1.2.3 Le cancer de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire est une tumeur maligne qui atteint un ou les deux ovaires. C'est essentiellement un adénocarcinome, c'est-à-dire une tumeur maligne qui s'organise en formant des structures glandulaires dans cet organe. Les cancers de l'ovaire représentent environ 30 % des cancers du tractus génital féminin. Comme pour la majorité des cancers, l'âge est l'un des facteurs les plus importants, avec un risque maximal autour de 75 ans. Même si les facteurs de risque restent assez mal connus, on distingue trois grands types de facteurs de risque de ce cancer : génétiques, hormonaux et ceux liés à l'environnement et au mode de vie (Chiaffarino F *et al.*, 2001).

Concernant les facteurs hormonaux, le risque de cancer de l'ovaire serait plus élevé pour les femmes n'ayant pas eu d'enfant ou qui ont eu leur premier enfant à un âge tardif, pour les femmes ayant une puberté précoce ou une ménopause tardive. À l'inverse, les femmes qui ont utilisé des contraceptifs oraux et les multipares ont un risque réduit de cancer de l'ovaire (Chiaffarino F *et al.*, 2001 ; Tung KH *et al.*, 2003). Une théorie suggère que le risque de cancer de l'ovaire augmente avec le nombre d'ovulations, du fait que chaque cycle ovarien fait subir à l'épithélium de l'ovaire un traumatisme dont il devra cicatriser (Fathalla MF, 1971). L'impact de l'utilisation des traitements hormonaux pour contrôler les effets de la ménopause est encore débattu, mais il semblerait que les œstrogènes et les œstro-progestatifs augmentent le risque de cancer de l'ovaire (Glud E *et al.*, 2004). Il y a une forte évidence que les hormones stéroïdes et gonadotrophines contribuent au développement du cancer de l'ovaire. En effet, les REs sont présents dans les 2/3 des tumeurs ovariennes où le RE α est exprimé dans les tumeurs épithéliales et stromales alors que le RE β est exprimé d'une façon abondante dans les cellules tumorales dérivées de la granulosa et à des niveaux plus bas dans les tumeurs mucineuses (séreuses) d'origine épithéliale (Chu S *et al.*, 2000).

Lors de la transformation maligne, l'expression du RE α et non pas du RE β augmente dans le tissu épithélial. Ceci montre que le RE β maintient les fonctions cellulaires normales de l'ovaire alors que le RE α est à la base de la progression et de l'invasion de la tumeur. Le statut de ces deux types de récepteurs est donc un marqueur important du pronostic du cancer (Rutherford T *et al.*, 2000).

D'autre part, des études *in vitro* ont montré que les œstrogènes sont capables de stimuler la prolifération des lignées cellulaires ovariennes. De ce fait, la prolifération cellulaire des lignées cancéreuses ovariennes est inhibée par les antagonistes des REs comme le tamoxifène même si ce dernier n'a montré aucune efficacité dans les essais cliniques (Jager W *et al.*, 1995 ; Hatch KD *et al.*, 1991).

I.1.3 Les hormones stéroïdes

Les hormones stéroïdes exercent leurs effets de deux façons différentes. Premièrement, en diffusant vers le noyau de la cellule, elles modulent l'expression des gènes par une activation ou une inhibition de la transcription de l'ADN en ARNm qui dicte la synthèse de nouvelles protéines. Ces effets se manifestent pendant des heures. Deuxièmement, ces hormones peuvent également agir au niveau de la membrane pour réguler l'activité de canaux ioniques. Toutefois, contrairement à la régulation de la transcription des gènes, cet effet

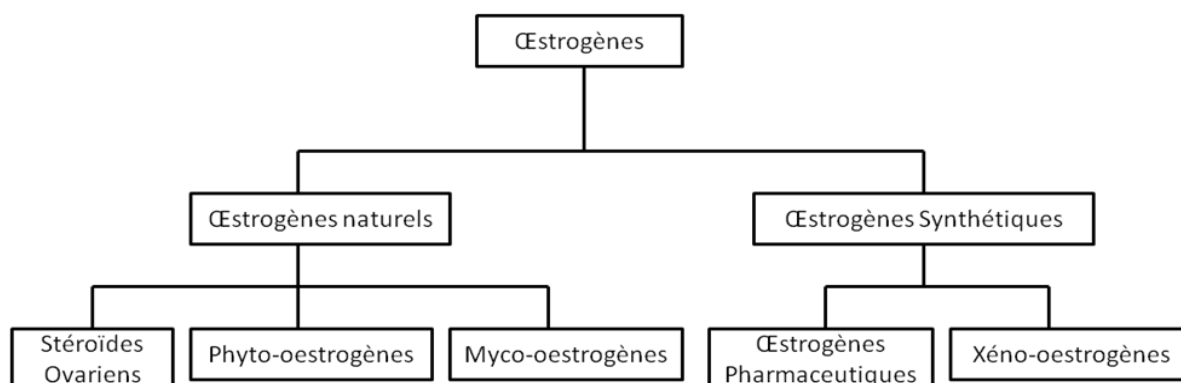


Figure 4 : Classification des œstrogènes.

I.1.3.2 Les œstrogènes naturels

I.1.3.2.1 Les stéroïdes ovariens

Les œstrogènes sont sécrétés principalement par les ovaires dans les cellules de la thèque et de la granulosa du follicule ovarien. Leur sécrétion est stimulée par l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et indirectement par l'hormone lutéinisante (LH) qui agit sur le corps jaune. Chez la femme, trois types d'hormones naturelles sont présentes selon trois stades : l'estrone (E1), le 17 β -œstradiol (E2) et l'estriol (E3) (Figure 3). La transformation des androgènes en œstrogènes se réalise préférentiellement par la conversion de l'androstènedione en E1 qui devient l'E2. Ce dernier constitue l'hormone naturelle la plus active sécrétée par la femme. Il permet le maintien de la fertilité et des caractères sexuels secondaires féminins (Tortora GJ et Grabowski SR, 2001). L'E2 est en équilibre avec l'E1 et l'E3 ; ce dernier s'avère la forme la moins active (Wilson JD et Foster DW, 1985) et peut être considéré comme un produit métabolique des autres œstrogènes. L'E2 est formé pendant le cycle ovarien qui comporte deux phases, la phase folliculaire et lutéale (

Figure 5). Lors de la phase folliculaire, sa concentration plasmatique augmente jusqu'à l'atteinte d'une pointe en vue de l'ovulation. Par la suite, sa concentration diminue considérablement avant la libération de l'ovule. Une seconde augmentation d'E2 est observée en phase lutéale, lorsque le corps jaune se développe. La dégénérescence de celui-ci en corps blanc entraîne une diminution progressive des concentrations d'E2 et de progestérone. Cette diminution d'hormones ovariennes stimule la libération de la gonadolibérine (GnRH), de la FSH et la LH de l'adénohypophyse (le lobe antérieur de l'hypophyse) qui initie la maturation d'un nouveau follicule (Tortora GJ et Grabowski SR, 2001). Après la fécondation de l'ovule, l'E3 sécrété majoritairement par les trophoblastes du placenta devient, au cours

des mois, l'œstrogène le plus important. À la fin de la période de fertilité, l'E2 est remplacé par l'E1 qui devient alors le principal œstrogène produit par la transformation des androgènes d'origine surrénalienne (Wilson JD et Foster DW, 1985).

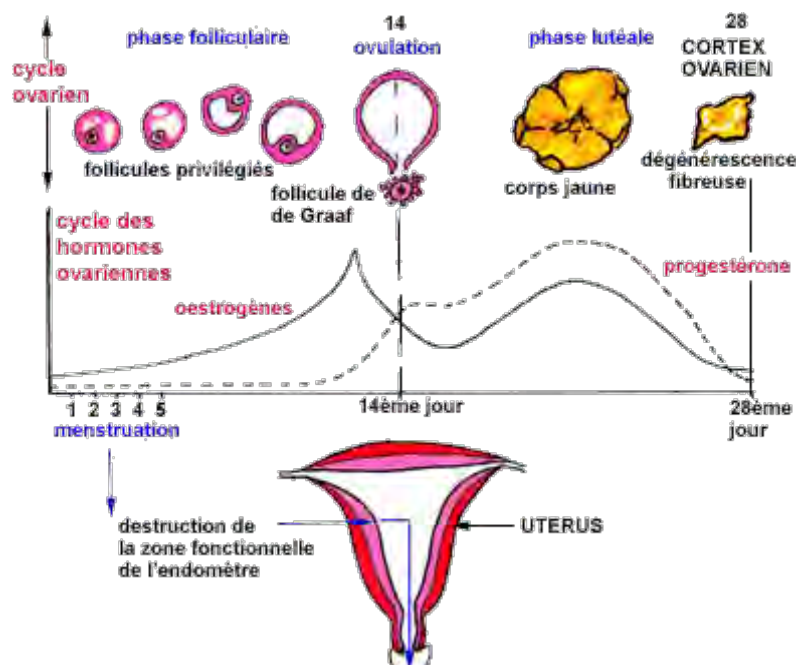


Figure 5 : Cycle de reproduction chez la femme³.

Le catabolisme des œstrogènes se fait principalement dans le foie où ils sont convertis en glucuroconjugués ou sulfoconjugués. Une partie est excrétée dans les urines sous forme de glucoronide ou de sulfate, mais les œstrogènes naturels peuvent également être éliminés dans les fèces. Ces dernières contiennent de 5 à 10 % d'œstrogènes et la majorité de ceux-ci (85 à 90 %) y sont sous forme non métabolisée (D'Ascenzo G *et al.*, 2003).

L'E2 est utilisé en médecine humaine pour traiter les déficiences (absence ou insuffisance) de sécrétion ovarienne à l'adolescence ou à l'âge adulte ainsi que les symptômes de la ménopause, notamment les troubles vasomoteurs. Cette hormone est également recommandée pour tenter de réduire la progression de l'ostéoporose post-ménopausique (Pharmacorama, 2008).

1.1.3.2.2 Les phyto-œstrogènes

Les phyto-œstrogènes (PE) sont un groupe de molécules non stéroïdiennes issues du règne végétal qui miment structuralement ou fonctionnellement les œstrogènes mammaires.

³ <http://blog.doctissimo.fr/vivi025/contraception-naturelle-184734/>

Ce sont des molécules naturelles trouvées dans une grande variété de végétaux comestibles possédant un effet bénéfique sur la santé des êtres humains.

En se basant sur leurs structures chimiques, les phyto-œstrogènes peuvent être classés en deux grands groupes, les phénoliques ou les non phénoliques. Les phyto-œstrogènes phénoliques comprennent quatre sous-groupes principaux : les isoflavonoïdes, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes. Les phyto-œstrogènes non phénoliques sont divisés majoritairement en composés terpénoïdes et saponines (Cos P *et al.*, 2003) (Figure 6).

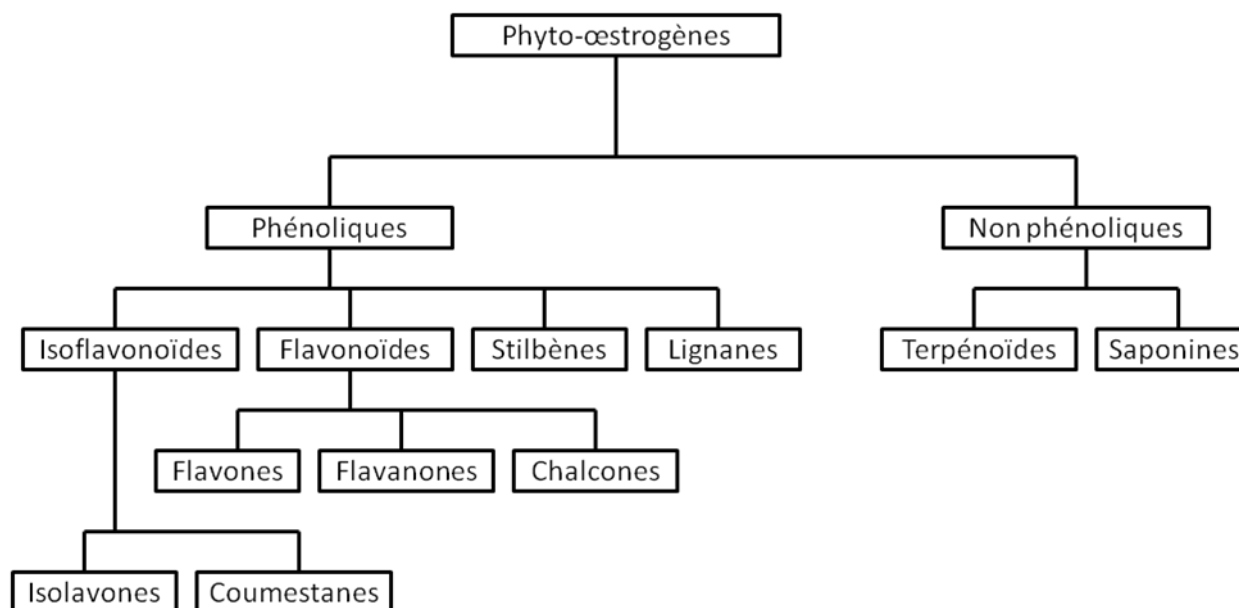


Figure 6 : Classification des phyto-œstrogènes (Cos P *et al.*, 2003).

Conceptuellement, l'effet biologique des phyto-œstrogènes s'inscrit dans un double contexte fonctionnel. Ce sont effectivement des molécules qui présentent une analogie structurale avec l'E2, notamment du fait de la présence d'un noyau phénolique et de groupements hydroxyles dans une position stéréochimique similaire. Ces caractéristiques leur confèrent la capacité de se fixer sur les récepteurs œstrogéniques et d'exercer des effets synergiques ou antagonistes des stéroïdes endogènes. Ainsi les phyto-œstrogènes peuvent être considérés comme des modulateurs des récepteurs aux œstrogènes (SERM, *selective estrogen receptor modulator*).

Les phyto-œstrogènes suscitent un intérêt croissant dans le cadre de la prise en charge de la ménopause. Ces PE sont recommandés comme des mesures prophylactiques alternatives efficaces de la THS chez les femmes après la ménopause.

Les fondements des nombreuses spéculations quant à l'implication des phyto-œstrogènes dans la prévention des cancers hormono-dépendants associent entre données

d'enquêtes écologiques et études de corrélation. Cependant, il est difficile d'extrapoler l'association positive de l'alimentation riche en phyto-œstrogène et la protection contre les cancers hormono-dépendants tels que les cancers du sein, de l'ovaire et de la prostate lors d'une investigation sur des modèles animaux et des approches *in vitro*.

Dans le cancer du sein, les études ont montré que l'activité des PE dépend de leur concentration ainsi que de la concentration des œstrogènes dans l'environnement. En effet, les PE exercent une faible activité œstrogénique dans un environnement pauvre en œstrogènes tandis qu'ils exercent une activité anti-œstrogénique dans un environnement riche en œstrogènes. Cette explication suggère qu'avant la ménopause chez la femme, où l'environnement est riche en œstrogènes, les PE peuvent jouer un rôle protecteur contre le cancer du sein alors qu'après la ménopause, lorsque l'environnement devient pauvre en œstrogènes, les PE vont stimuler la progression de ce cancer (Ososki AL et Kennelly EJ, 2003 ; Cos P *et al.*, 2003).

Dans le cancer de la prostate, le mécanisme d'action des PE est inconnu mais les études épidémiologiques convergent globalement vers une diminution du risque. Les effets protecteurs des PE peuvent être liés à son implication dans la régulation des voies de signalisations des récepteurs stéroïdes, à la réduction de la production d'androgène à travers l'inhibition de l'enzyme 5 α -réductase ou à la liaison des PE avec le RE β qui est la forme la plus prédominante dans la prostate (Ososki AL et Kennelly EJ, 2003).

L'incidence du cancer de l'ovaire en fonction de l'exposition aux PE a fait l'objet d'études de cohorte. Les résultats varient entre aucune association (Hedelin M *et al.*, 2011) une association positive (Chang ET *et al.*, 2008) et une association inverse (Edefonti V *et al.*, 2009) entre la consommation des phyto-œstrogènes et le cancer de l'ovaire. On doit toutefois considérer ces résultats à l'aune des limites des études ayant permis de les obtenir, celles-ci ayant été de courte durée.

I.1.3.2.3 Les myco-œstrogènes

Ce sont des composés produites par les champignons et capables de se lier, avec une bonne affinité, aux REs. Certaines mycotoxines produites par les champignons ; en particulier fusarium ; telles que la zéaralénone, la déoxynivalénol, ou encore la toxine T-2, sont des substances pouvant avoir une activité endocrinienne. Ce type de produits est retrouvé en fortes concentrations dans les produits alimentaires comme les céréales (maïs, orge) et l'huile végétale (Ndossi DG *et al.*, 2012).

I.1.3.3 Les œstrogènes synthétiques

Le 17 α -éthynyl estradiol (EE2), dérivé de l'E2, est le principal œstrogène de synthèse employé dans les contraceptifs oraux en association avec un progestatif de synthèse. L'EE2 administré par voie orale est peu métabolisé au niveau hépatique et possède une très longue demi-vie plasmatique (15 à 25 jours) contrairement aux œstrogènes naturels qui sont rapidement dégradés par le foie lorsqu'ils sont ingérés. L'EE2 peut également être utilisé pour traiter une déficience œstrogénique (Pharmacorama, 2008). Plusieurs produits pharmaceutiques commerciaux contenant de l'EE2 sont disponibles, à savoir Alesse®, Cyclen® ou Tri-Cyclen®, Seasonale® et Triquilar®.

I.1.4 Les récepteurs aux œstrogènes nucléaires : RE α et RE β

Le récepteur aux œstrogènes (RE) est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires dont la fonction, médiée par l'œstradiol, est l'activation de la transcription de gènes impliqués notamment dans la croissance, la différenciation cellulaire et les fonctions reproductrices. Il existe trois formes de récepteurs aux œstrogènes : RE α , RE β et RE δ (ou RE β a). Les isotypes α et β sont retrouvés chez toutes les espèces alors que l'isotype δ n'a été identifié que chez certaines espèces de poissons (Hawkins MB *et al.*, 2000 ; Ma CH *et al.*, 2000 ; Menuet A *et al.*, 2002).

Le gène codant pour le RE α fut cloné pour la première fois à partir de cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Walter P *et al.*, 1985) et séquencé un an plus tard (Greene GL *et al.*, 1986). Le RE β a été découvert 10 ans après, chez le rat tout d'abord (Kuiper G *et al.*, 1996) puis chez l'homme (Mosselman S *et al.*, 1996). Les gènes codant pour le RE α et le RE β sont organisés en 8 exons et 7 introns. Le gène du RE α , nommé ESR1, est localisé sur le chromosome 6 au locus q25. Celui du RE β , nommé ESR2, est situé sur le chromosome 14 au locus q23,2. Différentes isoformes issues soit d'épissage alternatif soit de l'utilisation d'un promoteur différent ont été décrites. Au moins quatre isoformes de hRE α et cinq isoformes de hRE β ont été identifiées (Nilsson S *et al.*, 2001 ; Ascenzi P *et al.*, 2006 ; Dahlman-Wright K *et al.*, 2006).

Les RE α et RE β peuvent être détectés dans un grand nombre de tissus. Dans certains organes, les deux types de récepteurs sont présents en quantité similaire alors que dans d'autres, l'un ou l'autre prédomine. Dans certains tissus, les deux récepteurs aux œstrogènes peuvent être exprimés mais dans des cellules différentes. Ainsi, le RE α est essentiellement exprimé dans les organes génitaux féminins [utérus, ovaires (cellules de la thèque), glande

mammaire] et masculins [stroma prostatique, testicules (cellules de Leydig), épидидymes], mais aussi dans les os, le foie et certaines régions du cerveau. L'isotype β du récepteur aux œstrogènes est retrouvé principalement dans le colon, les cellules épithéliales de la prostate, les testicules, les cellules de la granulosa (ovaires), la moelle épinière, les glandes salivaires et certaines régions du cerveau (Dahlman-Wright K *et al.*, 2006). De nombreux auteurs rapportent que le RE β possède un effet antiprolifératif contrairement au RE α (Weihua Z *et al.*, 2003 ; Koehler KF *et al.*, 2005 ; Ascenzi P *et al.*, 2006). Des études *in vitro* indiquent que le RE β est un modulateur important de la prolifération et de l'invasion des cellules cancéreuses (Lazennec G *et al.*, 2001).

Les récepteurs aux œstrogènes humains α et β , comme tous les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires présentent une organisation modulaire. Des études ont mis en évidence, par comparaison des séquences des récepteurs aux œstrogènes humains et de poulet, la présence de six domaines structuraux qu'ils ont notés de A à F de l'extrémité N-terminale à l'extrémité C-terminale (Krust A *et al.*, 1986) (Figure 7). Un ensemble de délétions de ces domaines structuraux a permis d'identifier 5 domaines fonctionnels, les domaines A et B ne présentant pas de fonctions distinctes.

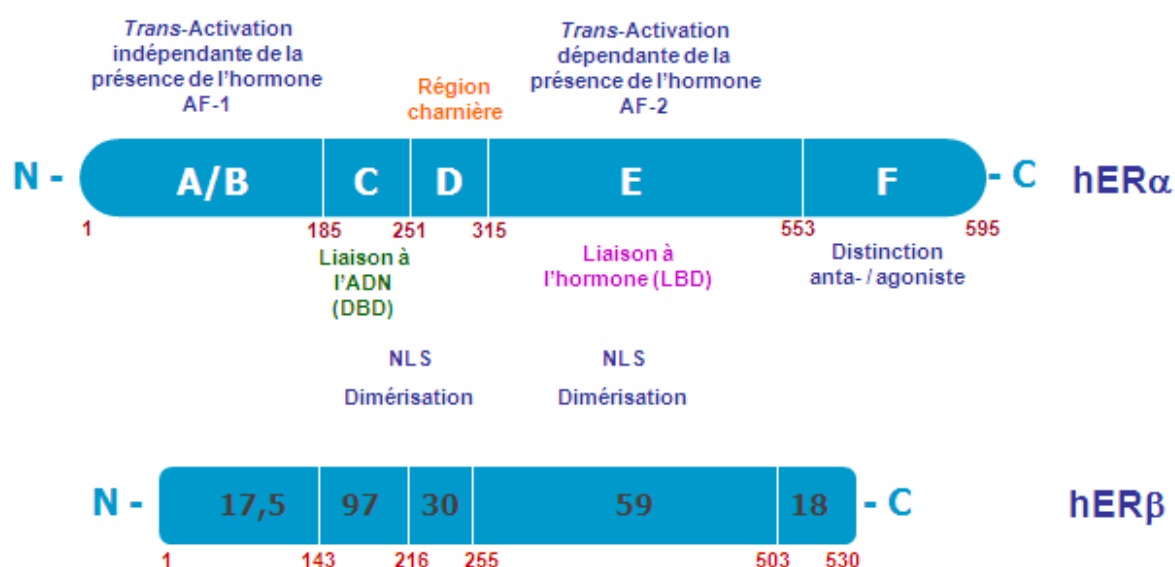


Figure 7 : Domaines structuraux des deux récepteurs humains. Cette figure présente également le pourcentage d'homologie de séquence des différents domaines de ces deux récepteurs (chiffres noirs) (Krust A *et al.*, 1986). Les chiffres rouges représentent la numérotation en résidus aminoacides dans la séquence. AF-1 : *Activation Function-1* ; AF-2 : *Activation Function-2* ; DBD : *DNA Binding Domain* ; LBD : *Ligand Binding Domain* ; NLS : *Nuclear Localization Site*.

Les outils de biologie moléculaire ont permis de disséquer les divers domaines fonctionnels des REs qui sont représentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Classification des fonctions des différents domaines des REs.

Domaines	Fonctions
A/B : N-terminal	- <i>Trans</i> -activation de l'expression de gènes cibles en l'absence d'hormone (AF-1) -Sites de phosphorylation et de sumoylation
C : DNA Binding Domain (DBD)	Liaison à l'ADN
D : Région charnière	-Adaptation aux différents éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) - Recrutement de protéines chaperonnes - Recrutement de coactivateurs -Interaction avec le cytosquelette intranucléaire
E : Ligand Binding Domain (LBD)	-Fixation du ligand - <i>Trans</i> -activation dépendante de la présence de l'hormone (AF-2) -Sites de fixation de coactivateurs et de Hsp-90
F : C-terminal	Non déterminée

De nombreux modèles et plus particulièrement de souris knock out (KO) ont permis de mettre en évidence un rôle physiologique et pathologique de ces récepteurs dans la glande mammaire, l'ovaire ou la prostate (Tableau 2) où le ratio des RE α /RE β va influencer la réponse aux œstrogènes de ces différents types cellulaires (Nilsson S *et al.*, 2001 ; Antal MC *et al.*, 2008 ; Förster C *et al.*, 2004 ; Wang RA *et al.*, 2002 ; Deroo BJ et Korach KS, 2006).

Tableau 2 : Rôles physiologiques et pathologiques des REs dans les tissus.

Tissu	Rôle physiologique	Pathologie
Sein	Développement de la glande mammaire (RE α) (Nilsson S <i>et al.</i> , 2001 et 2011)	-Cancer du sein hormono-dépendant -Protection par le RE β (Bardin A <i>et al.</i> , 2004) -Rôle pro-prolifératif du RE α (Lazennec G <i>et al.</i> , 2001)
Prostate	Croissance, développement et maintien	-Hyperplasie et cancer -Protection par RE β (McPherson SJ <i>et al.</i> , 2007 et 2010)
Ovaire	Sécrétion des œstrogènes, progestérone et testostérone	-Cancer de l'ovaire hormono-dépendant

I.1.5 La signalisation des REs

Les mécanismes de la cancérogénèse hormonale sont complexes. En absence de ligand, les REs sont séquestrés dans le cytosol et associés à des complexes multiprotéiques comprenant la protéine chaperonne Hsp-90 (Segnitz B et Gehring U, 1995) qui stabilise les récepteurs dans une conformation non active (Johnson JL et Toft DO, 1994). L'inhibition de la liaison de la Hsp-90 entraîne une dégradation des REs par le protéasome (Roe SM *et al.*, 1999 ; Maloney A et Workman P, 2002 ; Gougelet *et al.*, 2005).

La signalisation des REs passe par quatre voies majeures (Figure 8) :

- ✓ la voie génomique ERE (*Estrogen Response Element*)-dépendante classique,
- ✓ la voie génomique ERE-indépendante,
- ✓ la voie non-génomique : effet rapide des œstrogènes,
- ✓ la voie non-génomique à génomique : voie ligand-indépendante.

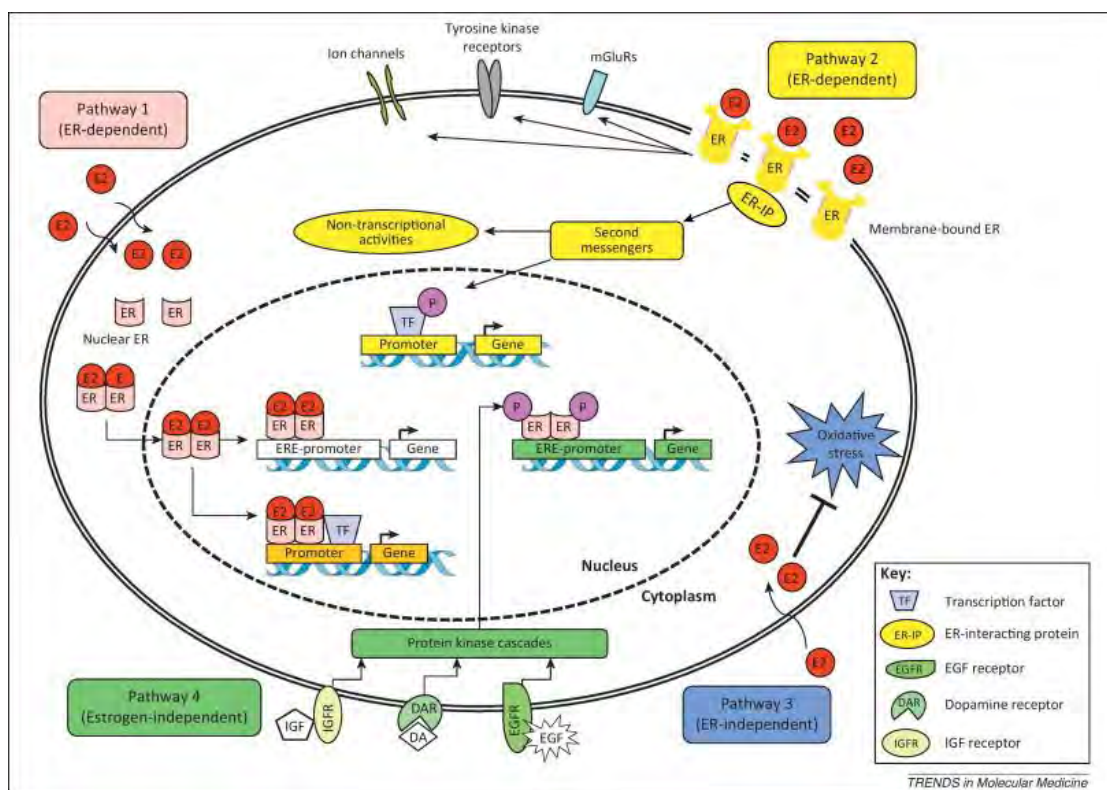


Figure 8 : Différentes voies de signalisation des œstrogènes (Cui J *et al.*, 2013).

Dans la voie classique, génomique ERE-dépendante : les œstrogènes étant des hormones lipophiles, elles diffusent passivement à travers les membranes cellulaires. Leur liaison au LBD des récepteurs aux œstrogènes va provoquer un changement de conformation permettant la libération du récepteur du complexe inactivateur et sa dimérisation. Les dimères

de récepteurs des œstrogènes vont alors interagir spécifiquement avec l'ADN, au niveau de leurs éléments de réponse appelés ERE. Ces derniers sont situés dans les promoteurs des gènes cibles des œstrogènes, tels que TFF1 ou cmyc (Klein-Hitpass L *et al.*, 1986 ; Klinge CM, 2001 ; Shang Y *et al.*, 2000).

La voie génomique indirecte implique des interactions protéines-protéines entre le RE α et d'autres facteurs de transcription, en réponse à la liaison des œstrogènes. En effet, le RE α est capable d'interagir avec les éléments de réponse d'autres facteurs de transcription, tels Fos/Jun (sites AP-1) (Kushner P *et al.*, 2000) ou SP-1 (Saville B *et al.*, 2000). Ces interactions vont permettre la régulation de l'expression des gènes par une interaction indirecte entre l'ADN et le récepteur des œstrogènes en conformation agoniste.

Les effets rapides des œstrogènes résultent de la voie non-génomique activée dans de nombreux tissus, mais pas encore bien comprise. Elle pourrait impliquer l'activation d'un récepteur à la membrane plasmique ou nucléaire. L'induction de la cascade d'effecteurs pourrait être activée directement par le récepteur ou mettre en jeu un second messager, menant à la réponse physiologique rapide n'impliquant pas la régulation de gènes. Les œstrogènes provoquent, par exemple, une mobilisation rapide du calcium intracellulaire, la production d'adénosine triphosphate (ATP), active la voie de signalisation des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) (Bjornstrom L *et al.*, 2005). Plusieurs études suggèrent que ces réponses pourraient être médiées par une sous-population des récepteurs aux œstrogènes RE α et RE β localisée au niveau de la membrane cellulaire (Bjornstrom L *et al.*, 2005).

Finalement, la voie de signalisation non-génomique à génomique est ligand-indépendante : elle est activée par d'autres voies de signalisation comme celle des facteurs de croissance, par exemple. Les récepteurs aux œstrogènes peuvent subir des modifications post-traductionnelles, telles que leur phosphorylation par la voie des MAPK en réponse à des signaux de croissance reçus par les cellules. Le récepteur aux œstrogènes RE α , ainsi activé, va se lier à ses EREs sur l'ADN et moduler la transcription de ses gènes cibles.

I.1.6 Traitement : l'hormonothérapie

Le traitement des cancers hormono-dépendants repose principalement sur l'ablation des tumeurs. De plus, suivant les cas, des traitements adjuvants sont administrés pour réduire la taille des tumeurs, préalablement à la chirurgie, ou après cette dernière, afin de réduire le

risque de rechute. Les traitements adjuvants actuels comprennent la chimiothérapie, la radiothérapie et l'hormonothérapie. Dans chaque cas, le bénéfice potentiel d'un tel traitement est mis en balance avec le risque de complications. En effet, ces thérapies ont des effets secondaires forts à court et à long terme. Afin de les guider dans leurs choix, les médecins disposent de divers facteurs pronostiques, comme la taille de la tumeur, l'invasion des ganglions lymphatiques, la présence de métastases, le grade et le type histologique des tumeurs ou encore l'expression de marqueurs, tels que les récepteurs aux œstrogènes, androgènes ou à la progestérone. D'autre part, l'impact des hormones sur le cancer des ovaires est encore débattu, mais il semblerait que les œstrogènes jouent un rôle important dans le développement, la croissance, l'invasion et la métastase des tumeurs ovariennes. Les chiffres montrent que 61 % à 79 % des cancers ovariennes expriment les REs. Le traitement par le tamoxifène est capable de guérir 13 % des cancers et amène un stade stable à 32 % des patientes (Zhang *et al*, 2008).

Deux des cancers hormonaux dépendants, le cancer du sein chez la femme et le cancer de la prostate chez l'homme, constituent par leur fréquence croissante et leur gravité, un problème de santé publique très préoccupant. Les influences des hormones stéroïdes sexuelles, œstrogènes et progestérone, d'une part et androgène d'autre part, présentent des points communs. Ce sont des agents promoteurs de tumeurs qui, en activant des récepteurs nucléaires spécifiques, vont stimuler la croissance et la division cellulaire dans leur tissu cible. Les inhibiteurs spécifiques de leur synthèse ou de leur action sur leur récepteur se sont donc avérés efficaces et sont largement utilisés au premier rang des traitements des cancers ciblés sur des molécules spécifiques intervenant dans leur génèse.

I.1.6.1 L'hormonothérapie dans le cancer du sein

La prédiction de la réponse à l'hormonothérapie est définie par la présence de récepteurs hormonaux (œstrogènes et progestérones) sur la tumeur primitive.

Dans le cancer du sein, les 2/3 des tumeurs mammaires expriment le récepteur aux œstrogènes RE α . La croissance de ces tumeurs, dites RE α -positives, dépend alors des œstrogènes. Les traitements hormonaux ont pour but de bloquer la prolifération des cellules œstrogéno-dépendantes : *i*) en diminuant le taux d'œstrogène circulant ou *ii*) en bloquant l'activité du récepteur RE α . Les deux principales thérapeutiques sont :

- L'inhibition de l'aromatase par des composés dont les chefs de file l'anastrozole et le letrozole, sont indiqués chez les femmes ménopausées. Ils réduisent les risques de rechute (Cuzick J, 2005).

- Les anti-œstrogènes sont divisés en deux classes, les anti-œstrogènes partiels et les anti-œstrogènes purs ou totaux.
 - Les anti-œstrogènes partiels ou SERM, tels que le tamoxifène, sont caractérisés par la dualité de leurs effets sur le récepteurs des œstrogènes RE α en fonctions des tissus (Tableau 3). Ainsi, le tamoxifène exerce aux effets antagonistes au niveau de la glande mammaire, par contre il constitue un agoniste du RE α dans les os et l'utérus (Fabian CJ et Kimler BF, 2005). Le tamoxifène est indiqué chez les femmes non ménopausées. Il réduit le risque de rechute ainsi que le risque de cancer du sein controlatéral.
 - Les anti-œstrogènes totaux ont été conçus à partir de la structure du 17 β -œstradiol comme point de départ, afin de bloquer complètement le RE α . A la fin des années 1980, le premier anti-œstrogène total est décrit : ICI164,384. Ce composé ne présente aucun effet agoniste et inhibe les effets agonistes du 17 β -œstradiol (et du tamoxifène) dans l'utérus. Par la suite d'autres anti-œstrogènes totaux ont été développés : ICI182,780 (fulvestrant) (Tableau 3), RU48668, RU39416, EM 139 et EM800. Le fulvestrant résulte de la volonté d'augmenter la biodisponibilité et l'affinité de l'ICI164,384 (Howell A *et al.*, 2002).

Tableau 3 : Activités biologiques des ligands des récepteurs aux œstrogènes dans leurs tissus cibles.

	Glande mammaire	Utérus	Os	Système cardiovasculaire
17 β -œstradiol	+	+	+	+
Tamoxifène	-	+	+	+
ICI182,780	-	-	-	-

+ : action agoniste. - : action antagoniste.

I.1.6.2 L'hormonothérapie dans le cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est un cancer hormono-dépendant pour lequel 80 % des malades présentent un cancer disséminé répondant au traitement hormonal. Mais, cette réponse est limitée dans le temps et la reprise de la progression a généralement lieu entre 18 et 36 mois après le début du traitement hormonal. A ce stade hormono-indépendant il n'y a pas

de traitement curatif. Le traitement aujourd'hui est centré sur la réduction de la maladie mesurable et la palliation des manifestations dues à la progression du cancer.

Le principe de l'hormonothérapie consiste à empêcher l'action stimulante de la testostérone sur les cellules cancéreuses pour arrêter le développement du cancer. Les médicaments utilisés sont des analogues ou des antagonistes de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires LH-RH, qui bloquent la production de la testostérone par les testicules (Denis L, 1998).

Des anti-androgènes peuvent être prescrits en complément des analogues de la LH-RH. Ils agissent comme des anti-hormones en prenant la place de la testostérone au niveau des récepteurs hormonaux des cellules (Chodak G *et al.*, 1995). Les anti-androgènes peuvent être des dérivés stéroïdiens tels que l'acétate de cyprotérone (Androcur®) ou non stéroïdiens tels que le flutamide (Euléxine®), le bicalutamide (Casodex®) et le nilutamide (Anandron®) (Masiello D *et al.*, 2002). Plus rarement, la production de testostérone est supprimée par l'ablation chirurgicale des testicules.

D'autre part, le fait que le cancer de la prostate possède les récepteurs aux œstrogènes RE α et RE β le rend sensible aux œstrogènes et aux anti-œstrogènes. En effet, le RE α participe à la progression de la tumeur tandis que le RE β est un élément suppresseur de tumeur. De ce fait, les œstrogènes et plus particulièrement l'œstrogène synthétique, le diethylstilbestrol (DES) ont été utilisés auparavant pour le traitement de ce cancer. En effet, leur action principale consiste à bloquer la sécrétion hypothalamique de LH-RH et à induire la suppression de la fabrication de LH par l'hypophyse, puis la testostérone par le testicule. Par contre, l'utilisation des androgènes a été limitée puisqu'ils induisent une toxicité cardiaque. Une solution consiste en l'utilisation des anti-œstrogènes/SERM comme le tamoxifène et le raloxifène qui sont capables d'arrêter la croissance de la tumeur d'une façon plus efficace que les traitements précédemment cités (Ho SM, 2004).

I.1.6.3 L'hormonothérapie dans le cancer de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire est un cancer hormono-dépendant où les deux types de REs sont présents dans les 2/3 des tumeurs ovariennes. Pourtant, l'hormonothérapie n'est pas une option pour le traitement de ces tumeurs même si certaines molécules (tamoxifène) sont efficaces *in vitro*. La limitation de l'utilisation de ces anti-œstrogènes émerge du fait qu'ils sont inefficaces dans les essais cliniques (Chu S *et al.*, 2000). Dès lors, les traitements actuellement utilisés pour traiter le cancer de l'ovaire sont la chirurgie, la chimiothérapie et à un moindre degré la radiothérapie (Jager W *et al.*, 1995).

I.1.7 Effets secondaires et limitations de l'hormonothérapie

Les effets secondaires de l'hormonothérapie se font sentir à plusieurs niveaux :

Les effets indésirables de la castration physique ou médicale sont dans les deux sexes une baisse de la libido, des bouffées de chaleur, l'ostéoporose, et l'impuissance chez l'homme (Harvey HA *et al.*, 1985).

Dans le traitement du cancer du sein, le tamoxifène entraîne une augmentation du risque de thrombose veineuse et d'embolie pulmonaire, un risque d'hyperplasie de la muqueuse endométriale, des polypes et parfois de cancer de l'endomètre (Shapiro C et Recht A, 2001).

Dans le traitement du cancer de la prostate, les œstrogènes synthétiques (Distilbène) sont devenus impopulaires, essentiellement en raison des complications métaboliques (hyperlipidémie), cardio-vasculaires (athéromatose, hypertension artérielle), thrombo emboliques. Ils entraînent également une gynécomastie ainsi qu'une impuissance (Cox RL et Crawford ED, 1995).

Les cancers hormono-dépendants répondent par une régression partielle ou complète, à défaut par une stabilisation.

Les paramètres permettant de prévoir une réponse à un traitement hormonal sont :

- ✓ L'expression de récepteurs hormonaux par la tumeur.

Par exemple, taux de réponse chez les patientes RE+RP+ > RE+RP- > RE-RP+ > RE-RP.

Les tumeurs RE-RP- ne répondent pas à l'hormonothérapie, et ne doivent pas être traitées par l'hormonothérapie.

- ✓ Le grade de différenciation tumorale : les cancers bien différenciés ont plus de chance de répondre que les cancers indifférenciés.
- ✓ La cinétique de croissance tumorale : une faible évolution tumorale, un intervalle libre long entre le traitement initial et la rechute vont dans le sens d'une hormono-sensibilité potentielle.
- ✓ Le site tumoral : les métastases osseuses répondent plus souvent à l'hormonothérapie que les métastases viscérales (cancer du sein et de la prostate) [Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), 2005].

Une limitation de l'hormonothérapie est due aux mécanismes d'acquisition de résistance à la castration, aux anti-œstrogènes (cancer du sein) et aux anti-androgènes (prostate). Un exemple de la résistance est la perte d'expression du RE due à une mutation du récepteur (20

% des cas) (Kuukasjärvi T *et al.*, 1996). Ces mécanismes de résistances sont encore mal connus. Les théories actuelles vont en faveur de l'émergence progressive de clones résistants sélectionnés par l'hormonothérapie ou de la présence des cellules souches cancéreuses dans la tumeur (Li X *et al.*, 2008 ; Tanei T *et al.*, 2009).

I.2 Produit naturel comme traitement alternatif : la férutinine

De nombreux composés naturels ont une action contre le cancer tout en limitant les effets secondaires des thérapies actuelles. Néanmoins le manque d'études leur correspondant, fait qu'il n'est pas possible en l'état actuel des connaissances, de les proposer comme des traitements alternatifs mais seulement en compléments thérapeutiques. Ainsi, dans le cas des cancers hormono-dépendants, les phyto-œstrogènes ont attiré l'attention des chercheurs en tant que traitements optionnels capables de supprimer les effets secondaires des médicaments commerciaux ou de remédier aux problèmes de résistance acquis des médicaments usuels. La férutinine est une phyto-œstrogène appartenant à la famille des sesquiterpènes qui a été trouvée dans différentes espèces de plantes de la famille des Apiacées.

I.2.1 Classification botanique de la plante d'intérêt

I.2.1.1 La famille des Apiacées

La plante concernée dans cette étude appartient à la famille des Apiacées (Apiaceae), appelée aussi Ombellifère (Umbelliferae). C'est une famille de plantes appartenant à la classe des Magnoliopsida (Dicotylédones). Elle est composée de 1400 espèces réparties en 300 genres environ, qu'on trouve sur presque tout le globe, mais surtout dans les régions tempérées de l'hémisphère boréal. C'est une famille relativement homogène, caractérisée notamment par son inflorescence typique, l'ombelle. Ce sont des plantes herbacées, annuelles, bisannuelles ou vivaces, parfois arbustives. Les feuilles sont alternées, composées, rarement simples. Souvent, les pétioles sont élargis à leur base, engainant la tige qui est souvent creuse. Les fleurs sont réunies en ombelles simples ou composées, munies de bractées appelées involucelles à la base (Coste H et Flahault CH, 1998). Parmi les Apiacées on compte des plantes alimentaires (la carotte, *Daucus carota*), des condiments (le cumin, *Cuminum cyminum*), des plantes médicinales (le khella, *Ammi visnaga* et le fenouil, *Foeniculum vulgare*) ainsi que des plantes toxiques (la grande ciguë, *Conium maculatum*) (Bruneton J, 2009). La férutinine quant à elle a été isolée du genre *Ferula* L.

La classification botanique du genre *Ferula* L. est la suivante :

Position systématique du genre *Ferula* L.

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta (Angiospermes)
Classe	Magnoliopsida (Dicotylédones)
Clade	Campanulidées ou Euastéridées
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae
Genre	<i>Ferula</i> L.

I.2.1.2 Le genre *Ferula* L.

Les plantes du genre *Ferula* L. croissent souvent dans les régions arides. Ce genre comporte environ 170 espèces présentes du bassin méditerranéen jusqu'à l'Asie centrale (Pimenov MG et Leonov MV, 1993) (Figure 9).

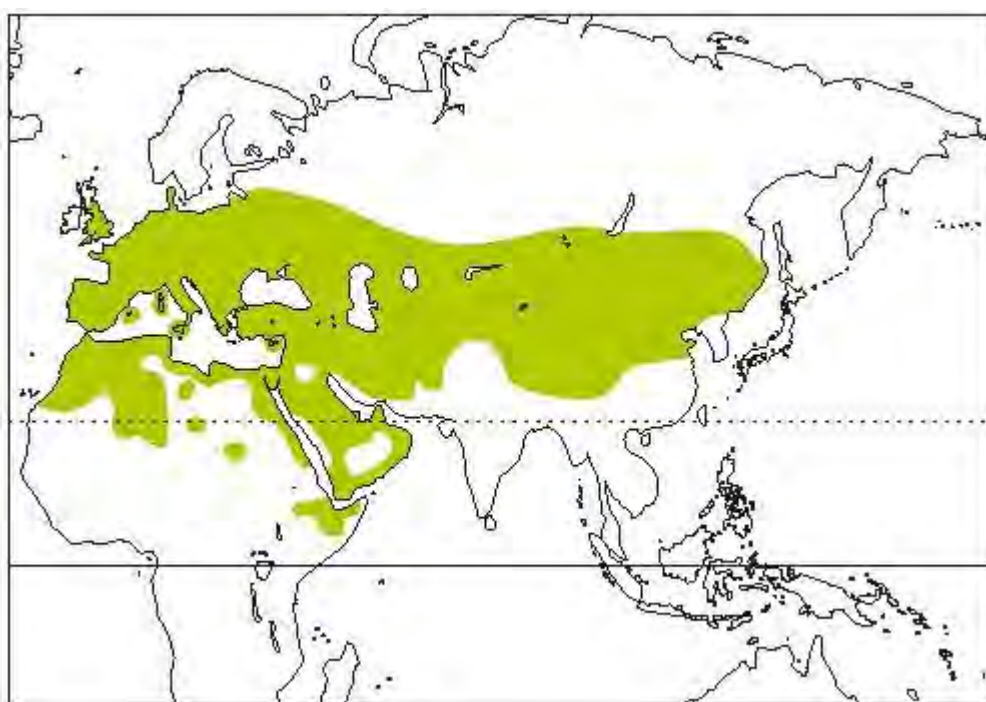


Figure 9 : Distribution géographique du genre *Ferula* L. du bassin méditerranéen jusqu'à l'Asie centrale (Coste H et Flahault CH, 1998).

De nombreuses espèces de *Ferula* sont connues depuis l'antiquité en tant que sources de gommés-oléorésines (des sécrétions obtenues par entailles répétées de la partie supérieure des racines) surtout le galbanum et l'ase fétide. Cette dernière est réputée carminative et spasmolytique (Bruneton J, 2009). Elle est rarement toxique.

I.2.1.3 L'espèce : *Ferula hermonis* boiss (Sallua, Sallu)

Parmi les espèces connues de *Ferula* pour leur utilisation en médecine traditionnelle, se trouve une espèce endémique du Liban, la *Ferula hermonis* (*F. hermonis*). Elle pousse vers 2500 m d'altitude au mont Hermon. Elle est localement connue sous le nom de «Shilsh-el-zallooh».

I.2.1.3.1 Morphologie

La plante est glabre, vivace, des bords de champs et pentes rocheuses en régions montagneuse de Syrie et du Liban, sa tige peut mesurer 1,5 m, et se ramifier en branches dénudées à leur base.

Ses feuilles comprenant 5 ou 6 pennes, ont un contour global triangulaire, mais sont en fait profondément disséquées en une multitude d'éléments linéaires obtus.

L'inflorescence de cette Apiacées est une panicule d'ombelles composées, chaque ombellule comptant 10 à 15 rayons. Aux fleurs à pétales vert-blanchâtres, succèdent des fruits elliptiques, oblongs, longs de 10 à 13 mm, et agrémentés de larges écailles latérales (Boullard B, 2001) (

Figure 10).

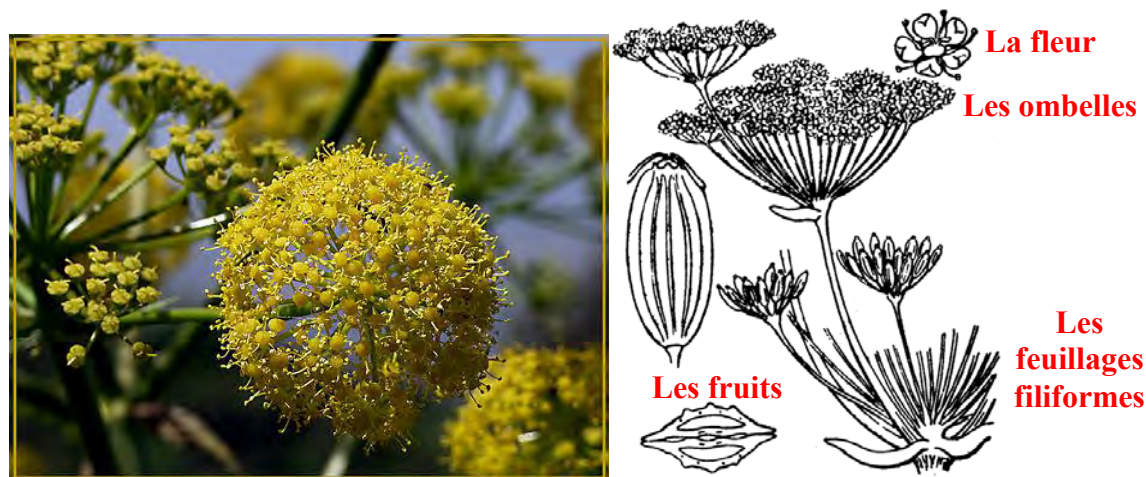


Figure 10 : Plante de *Ferula hermonis*. à gauche l'annotation des différentes parties de la plante : la fleur, les ombelles, les feuillages filiformes et les fruits ; à droite la photo de la plante (Coste H et Flahault CH, 1998).

Le fruit est ovale ou oblong, comprimé par le dos, et entouré d'un rebord plan ; les méricarpes ont 5 côtés, les trois dorsales filiformes égales, les deux marginales dilatées en aile aplanie ; les vallécules sont à plusieurs bandelettes, le carpophore est libre, bifide et les graines sont à faces commissurales planes (Coste H et Flahault CH, 1998).

Les caractéristiques des fruits et des feuilles basales sont essentielles pour l'identification précise des *Ferula*.

I.2.1.3.2 Utilisation en médecine traditionnelle

L'utilisation de *F. hermonis* avait dans le temps une grande importance pour traiter les infections de la peau, la fièvre, la dysenterie ainsi que pour activer le système nerveux lors d'une neurasthénie. Son utilisation s'est avérée surtout importante pour traiter les troubles sexuels. En effet, la *F. hermonis* est connue depuis le temps du roi Salomon et des reines de Saba, pour ses effets aphrodisiaques. L'industrie pharmaceutique s'intéresse donc à cette Apiacée pour les aptitudes que l'on dit comparables à celles du viagra (d'où son surnom « viagra du moyen Orient »), d'autant qu'elle ne présente pas d'effets indésirables sur le cœur (Said O *et al.*, 2002).

I.2.2 Activités biologiques

Les données phytochimiques du genre *Ferula* ont été rapidement développées pendant les 20 dernières années. Une centaine d'espèces de ce genre a déjà fait l'objet d'études, et des centaines de composés ont été identifiés dont la majorité appartient aux terpénoïdes, plus précisément aux dérivés sesquiterpéniques.

A la fois des huiles essentielles, des extraits bruts et des produits purs obtenus de la plante de *F. hermonis* ont été testés vis-à-vis de plusieurs activités (antibactérienne, antivirale, œstrogénique, anticoagulante, ...). La férutinine est le composé qui présente le plus large spectre d'activités biologiques.

I.2.2.1 Activité sexuelle et œstrogénique

L'activité sexuelle de la plante est connue depuis longtemps. Différentes études ont montré que la férutinine est la phytohormone responsable de l'effet aphrodisiaque de *F. hermonis*.

L'activité sexuelle a été mise en évidence par des études *in vivo* sur des rats mâles et femelles. Chez les rats mâles, l'activité de la férutinine dépend de sa dose et de sa durée d'administration. Par exemple, une administration aiguë de la férutinine (2,5 mg/Kg) est capable d'améliorer la motivation et la performance sexuelle des rats. Par contre, une administration chronique de la molécule (0,25 mg/Kg, quotidiennement pendant 10 jours)

augmente le niveau de la testostérone et affecte négativement le comportement de la copulation (Zanoli P *et al.*, 2005).

Parallèlement chez les rats femelles, l'activité de la férutinine dépend du profil hormonal. En effet, lorsque la molécule est administrée seule, elle exerce une fonction œstrogénique alors qu'elle possède une fonction anti-œstrogénique lorsqu'elle coexiste avec l'œstradiol. De ce fait, la férutinine pourrait avoir des applications thérapeutiques dans les deux périodes de pré et post-ménopause chez les femmes. Ceci serait un argument supplémentaire pour son utilisation dans le cadre d'un traitement hormonal substitutif (Zavatti M *et al.*, 2009 ; Zanoli P *et al.*, 2009).

L'activité sexuelle est directement liée à la fonction œstrogénique de la molécule. En effet, la férutinine est un phyto-œstrogène capable de se lier aux récepteurs aux œstrogènes RE α et RE β et d'induire des effets similaires à ceux de l'hormone naturelle, l'œstrogène. Sa liaison aux récepteurs représente le 1/10 de celle de l'œstradiol avec des affinités plus grandes pour le RE α , CI₅₀= 33,1 nM, que pour le RE β , CI₅₀=180,5 nM. Ikeda K *et al* ont montré que la férutinine est agoniste du RE α et agoniste/antagoniste du RE β . Cette double fonction a permis de classer cette molécule sous le nom de SERM (Ikeda K *et al.*, 2002).

I.2.2.2 Activité sur le métabolisme osseux

L'implication de la férutinine dans le métabolisme osseux s'est surtout développée pendant les cinq dernières années vue son rôle protecteur vis-à-vis de l'ostéoporose. En effet, la férutinine est capable de prévenir la perte de masse osseuse et de réduire la prise de poids chez des rats ayant subi une ovariectomie (déficience en œstrogène) (Palumbo C *et al.*, 2009 ; Ferretti M *et al.*, 2010). Elle induit une inhibition de l'érosion des ostéoclastes ce qui diminue la résorption osseuse d'une part (Cavani F *et al.*, 2012), et stimule la prolifération ainsi que la différenciation des ostéoblastes d'autre part (Zavatti M *et al.*, 2013). L'utilisation de la férutinine pour le traitement de l'ostéoporose présenterait un avantage sur le traitement hormonal substitutif actuel du fait qu'elle exerce un effet protecteur contre le cancer de l'endomètre. Ceci ferait de cette molécule une alternative naturelle importante au traitement hormonal substitutif (Ferretti M *et al.*, 2012).

I.2.2.3 Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire de la férutinine est étudiée chez un modèle animal. Le composé exerce ses effets seulement durant la phase initiale de l'inflammation où les

histamines et les sérotonines interviennent. La férutinine pourrait donc antagoniser l'effet de ces médiateurs à travers un mécanisme plus efficace que celui de l'aspirine (Geroushi A *et al.*, 2011).

I.2.2.4 Activité antibactérienne

La férutinine est active contre les souches bactériennes gram-positives et gram-négatives comme le montre le Tableau 4 suivant : (Galal AM *et al.*, 2001 ; Tamemoto K *et al.*, 2001 ; Ibraheim ZZ *et al.*, 2012 ; Kuete V *et al.*, 2012 ; Liu X *et al.*, 2012).

Tableau 4 : Activités antibactériennes de la férutinine.

Organisme	CMI (µg/ml)		Organisme	CMI (µg/ml)	
	Chloramph én-icole	Férutinine		Chloramph én-icole	Férutinine
Gram-positive			Gram-négative		
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 1023 a*	4	8	<i>Salmonella typhimurium</i> IFO 13245	2	>250
<i>Staphylococcus aureus</i> No. 0024 b*	16	16	<i>Proteus mirabilis</i> IFO 3849	16	>250
<i>Staphylococcus epidermidis</i> IFO 3762	2	16	<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	8	>250
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 21212	2	31	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739-10536) AG100 AG102	4-2 38 2	Na
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3134	2	16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01 PA124	32 32	Na
<i>Candida albicans</i>	nd	>50	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 11296 KP55	4 64	Na

<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	nd	2	<i>Providencia stuartii</i> NAE16 ATCC 29916	32 32	Na
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> c*	nd	2	-	-	-
<i>Mycobacterium bovis</i>	nd	1,56	-	-	-

CMI : concentration minimale inhibitrice. **a*** Méthicilline-sensible *Staphylococcus aureus*. **b*** Méthicilline-résistante *Staphylococcus aureus*. **c*** souche “Multi-drug” résistante *Mycobacterium tuberculosis*. Chloramphénicol : antibiotique de référence. na : non active. nd : non déterminée.

L'extrait éthanolique de la résine sécrétée par *F. hermonis* contient 52 % de férutinine et possède une activité antibactérienne importante. Cet extrait dispose d'une grande efficacité contre les bactéries gram-négatives alors que l'extrait brut obtenu à partir des racines de cette même plante est plus efficace contre les bactéries gram-positives (Hilan C *et al.*, 2007).

D'autre part, l'efficacité de la plante contre l'infection par les staphylocoques est étudiée par des études *in vivo*. Les résultats ont montré un pouvoir potentiel de la plante contre la souche *staphylococcus aureus* ATCC 29213 avec des effets hématiniques, puisque la plante est riche en ions fer et cuivre. Des effets hépatoprotecteurs, hypolipidémiques, hypoglycémiques et antioxydants ont été aussi observés, probablement liés à la richesse de la plante avec les vitamines E, A et les acides gras insaturés surtout les acides linoléiques et les acides α -linoléiques (Kassem SS *et al.*, 2012).

En plus du large spectre d'activité antibactérienne que possède la férutinine, elle exerce une activité antifongique importante. Elle est notamment capable d'inhiber la souche de *Trichophyton Mentagrophytes* avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 0,25µg/ml (Al-Ja'fari AH *et al.*, 2013).

1.2.2.5 Activités diverses

D'autres activités biologiques ont été attribuées à la plante *F. hermonis* et plus spécifiquement à son composé actif, la férutinine.

En ce qui concerne l'extrait aqueux de *F. hermonis*, il est capable d'induire une augmentation de la masse des fibres musculaires squelettiques surtout lors d'un exercice à court terme (Allouh MZ, 2011). En outre, l'extrait aqueux de la plante protège les érythrocytes contre la peroxydation des lipides mais pas contre la dégradation des protéines, ce qui fait qu'elle est incapable de restaurer la perte de la déformation érythrocytaire ou de

l'élévation de la fragilité osmotique causées par une exposition au peroxyde d'hydrogène H_2O_2 pour 60 min dans une analyse *in vitro* (Suboh SM *et al.*, 2004).

L'extrait aqueux de « Zallouh » (52 % férutinol benzoate et 30 % férutinine) possède un effet inhibiteur sur la corrosion du C-steel dans une solution acide (HCl). L'efficacité de cette inhibition est proportionnelle à la concentration de l'extrait et inversement proportionnelle à la température (El-Etre AY, 2008).

En revanche, l'extrait aqueux ou éthanolique de *F. hermonis* n'est active ni sur l'acétylcholinestérase, ni sur le site de GABA-benzodiazépine ou sur le transporteur de la sérotonine (Salah SM *et al.*, 2005). L'inactivité de l'extrait brut méthanolique de la plante a aussi été prouvée vis-à-vis de l'enzyme phosphodiésterase-5A1 (PDE5A1) (Dell'Aghi M *et al.*, 2008).

De plus, l'extrait brut éthanolique de *F. hermonis* possède une activité insecticide contre la larve de l'insecte *Culex pipiens molestus* avec une concentration létale, $LC_{50} = 44$ mg/ml (Traboulsi AF *et al.*, 2005).

En ce qui concerne la férutinine, l'activité antioxydante a été évaluée en utilisant le test au 2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyl (DPPH, radical libre). La molécule est capable de piéger les radicaux libres avec une $CI_{50} = 13,2$ μ M, une activité très proche de celle de l'acide ascorbique ($CI_{50} = 12,5$ μ M) qui est l'antioxydant de référence (Ibraheim ZZ *et al.*, 2012).

Les propriétés ionophorétiques de la férutinine se mesurent par sa capacité à augmenter la perméabilité des thymocytes, de la mitochondrie, du réticulum sarcoplasmique, des liposomes et de la bicouche lipidique pour les ions Calcium (Ca^{2+}) (Zamaraeva MV *et al.*, 1997). Le résultat est une élévation du potentiel membranaire en augmentant la concentration de ces ions dans le compartiment intracellulaire surtout dans la lignée cellulaire leucémique, Jurkat. Ceci pourrait expliquer l'effet apoptotique de la molécule sur cette lignée cancéreuse par la voie intrinsèque (Macho A *et al.*, 2004). Une étude récente menée en 2013 a montré l'existence de l'effet apoptotique de la férutinine sur les globules rouges. En effet, la férutinine est capable d'induire l'érythrocytose des globules rouges, ceci en élevant la concentration des ions calcium et en activant la caspase 3 (Gao M *et al.*, 2013).

D'autre part, la férutinine possède un effet direct sur la voie de signalisation dans le tissu nerveux. En effet, elle est capable d'augmenter l'activité de l'enzyme acide nitrique synthétase libérant ainsi l'acide nitrique qui est un second messager connu pour ses larges effets de l'homéostasie à la pathologie. En outre, la férutinine est à la base d'une accumulation de l'inositol mono-phosphate dans l'émence médiane du cerveau (Colman-Saizarbitoria T *et al.*, 2006).

I.2.2.6 Férutinine et cancer

Différentes études ont montré que la férutinine exerçait des activités chimiopréventives ou cytotoxiques vis-à-vis de plusieurs lignées cancéreuses.

I.2.2.6.1 Activité cytotoxique vis-à-vis de la lignée cellulaire œstrogéno-dépendante, MCF-7

Lhuiler A *et al.* ont été les premiers en 2005, à décrire une activité cytotoxique pour la férutinine (Lhuiler A *et al.*, 2005) (Tableau 5).

Tableau 5 : Activité cytotoxique de la férutinine sur les cellules MCF-7 (Lhuiler A *et al.*, 2005).

	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	% cellule en Prolifération
Férutinine	0,1	53,4
	1	71,1
	10	-146,8

Ils l'ont testée sur des cellules œstrogéno-dépendantes du cancer de sein humain, MCF-7 et ont montré qu'elle avait un effet biphasique, prolifératif à basses concentrations et antiprolifératif à hautes concentrations. Cet effet est sans doute dû à ses propriétés anti-œstrogéniques comme ça a été observé dans d'autres daucanes.

Dans un travail plus récent (2012), Kuete V *et al.* ont aussi testé l'activité antiproliférative de la férutinine vis-à-vis de cette même lignée MCF-7 en comparaison avec la doxorubicine (Kuete V *et al.*, 2012) (Tableau 6).

Tableau 6 : Activité cytotoxique de la férutinine sur les cellules MCF-7 (Kuete V *et al.*, 2012).

CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	
Férutinine	2,47 \pm 0,34
Doxorubicine	0,59 \pm 0,05

Ils ont trouvé une activité bien meilleure que celle observée précédemment.

Plus récemment encore, en 2014, Matin MM *et al.* ont retesté l'activité de la férutinine sur la lignée MCF-7 toujours en comparaison avec la doxorubicine (Matin MM *et al.*, 2014). La cytotoxicité a été étudiée en fonction du temps (24 h, 48 h, 72 h) (Tableau 7).

Tableau 7 : Activité cytotoxique de la férutinine sur les cellules MCF-7 (Matin MM *et al.*, 2014).

	CI ₅₀ (µg/mL)		
	24h	48h	72h
Férutinine	37	32	29
Doxorubicine	>64	>64	64

La disparité dans les résultats trouvés pourrait peut être s'expliquer par le degré de différenciation des lignées cellulaires utilisées suivant qu'elles expriment plus ou moins les REs.

I.2.2.6.2 Activité cytotoxique vis-à-vis des lignées cellulaires œstrogéno-indépendantes

La férutinine dans le cadre de ces études, ou d'autres a aussi été testée sur d'autres lignées cellulaires cancéreuses parmi lesquelles COLO 320HSR, LS-174T, WiDr, CT26, HT29 (lignées humaines du colon), les lignées leucémiques humaines : Jurkat, K562R, HL-60, RS 4 ; 11, CCRF-CEM, SEM et la lignée résistante CEM /ADR5000 et murine DA1-3b/M2^{BCR-ABL}. D'autres lignées telles que TCC (lignée cellulaire de la vessie), Hela (lignée cellulaire du col de l'utérus), A549 (lignée cellulaire des poumons) et MiaPaCa-2 (lignée humaine pancréatique) ont aussi été testées (Tableau 8).

Tableau 8 : Cytotoxicité de la férutinine sur les différentes lignées cellulaires œstrogéno-indépendantes.

Lignées cellulaires	Férutinine	Références
WiDr a* COLO320-HSR a* LS-174 a*	0,81±0,1 3,0±0,4 8,0±1,1	Poli F <i>et al.</i> , 2005
K562R a* DA1-3b/M2 ^{BCR-ABL} a*	25,3±0,5 29,1±1,0	Alkhatib R <i>et al.</i> , 2008
TCC a*	67	Matin MM <i>et al.</i> , 2014
CCRF-CEM a* CEM/ADR5000 a* MiaPaCa-2 a*	55±5,97 54±3,91 20±2,54	Kuete V <i>et al.</i> , 2012
Jurkat b**	40,3%	Macho <i>et al.</i> , 2004
CT26 c*** HT29 c***	26 29	Arghiani N <i>et al.</i> , 2014
Hela A549 HL-60 RS 4;11 SEM	na na na na na	Dall'Acqua S <i>et al.</i> , 2011

a* : µM, dose inhibitrice de croissance de 50 % (DI₅₀%) des cellules après 72 h de traitement. **b**** : % apoptose des cellules Jurkat après un traitement de 50 µM pendant 18 h. na : non actif. **c***** : µg/ml, dose inhibitrice de 50 % des cellules après 72 h de traitement.

I.2.3 Structure chimique de la férutinine et de composés apparentés

D'un point de vue structural, la férutinine appartient à la famille des terpénoïdes, plus précisément c'est un sesquiterpène de type daucane.

I.2.3.1 Les terpènes

Les terpènes sont des produits naturels, formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta-carbonées ramifiées dérivées du 2-méthyl butadiène, appelées unités isopréniques (Figure 11).

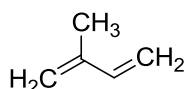


Figure 11 : Structure d'unité isoprénique.

La présence d'une grande variété de terpènes, cycliques et non cycliques, dans les plantes, fait intervenir un nombre variable d'éléments isopréniques. Suivant le nombre entier n d'unités pentacarbonées ramifiées (C5), on peut faire la classification suivante :

- pour $n = 2$: les monoterpènes (C10)
- pour $n = 3$: les sesquiterpènes (C15)
- pour $n = 4$: les diterpènes (C20)
- pour $n = 5$: les sesterpènes (C25)
- pour $n = 6$: les triterpènes (C30)
- pour $n = 8$: les polyterpènes

Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc, ...). Les composés terpéniques sont en grande majorité des métabolites secondaires sans fonction directe dans la croissance des végétaux. Ces métabolites sont responsables de la couleur et de l'odeur des plantes et des épices (piments, fenouil), certains d'entre eux ont des fonctions écologiques importantes mais la plupart (les mono et sesquiterpènes) possède surtout des activités œstrogéniques/anti-œstrogéniques chez les êtres humains.

I.2.3.1.1 Les sesquiterpènes naturels

Le monde végétal est une source importante de molécules dérivées des daucanes de nature sesquiterpéniques. Ces molécules ont des fonctions dans le métabolisme secondaire des plantes (formation de la lignine, hormones de défense, ...). Les sesquiterpènes varient en structure et en rendement en fonction des plantes. Ils sont abondants dans le genre *Ferula* où ils constituent les produits majeurs de notre plante d'intérêt, la *F. hermonis*.

I.2.3.1.2 Sesquiterpènes de différentes sources

L'identification de sesquiterpènes de type daucane issus de différentes sources a commencé dans les années 1970 et continue de nos jours. Les structures de ces sesquiterpènes varient des plus simples (Feldman A, 1865) aux plus complexes (Holub M *et al*, 1967). Parmi ces composés, ce sont surtout les dérivés contenant deux ou plusieurs sites d'oxygénation (où au moins un groupement hydroxyle est estérifié) et les dérivés acylés du jaeschkenadiol qui prédominent. Ces sesquiterpènes ne sont apparentés ni en structures ni en substitutions, ce qui souligne la richesse du monde végétal en molécules sesquiterpéniques, quelques exemples

sont représentés dans la Figure 12 (Ghisalberti EL, 1994 ; Maurya R *et al.*, 1997 ; Zhao YX *et al.*, 2012 ; Liu SJ *et al.*, 2014).

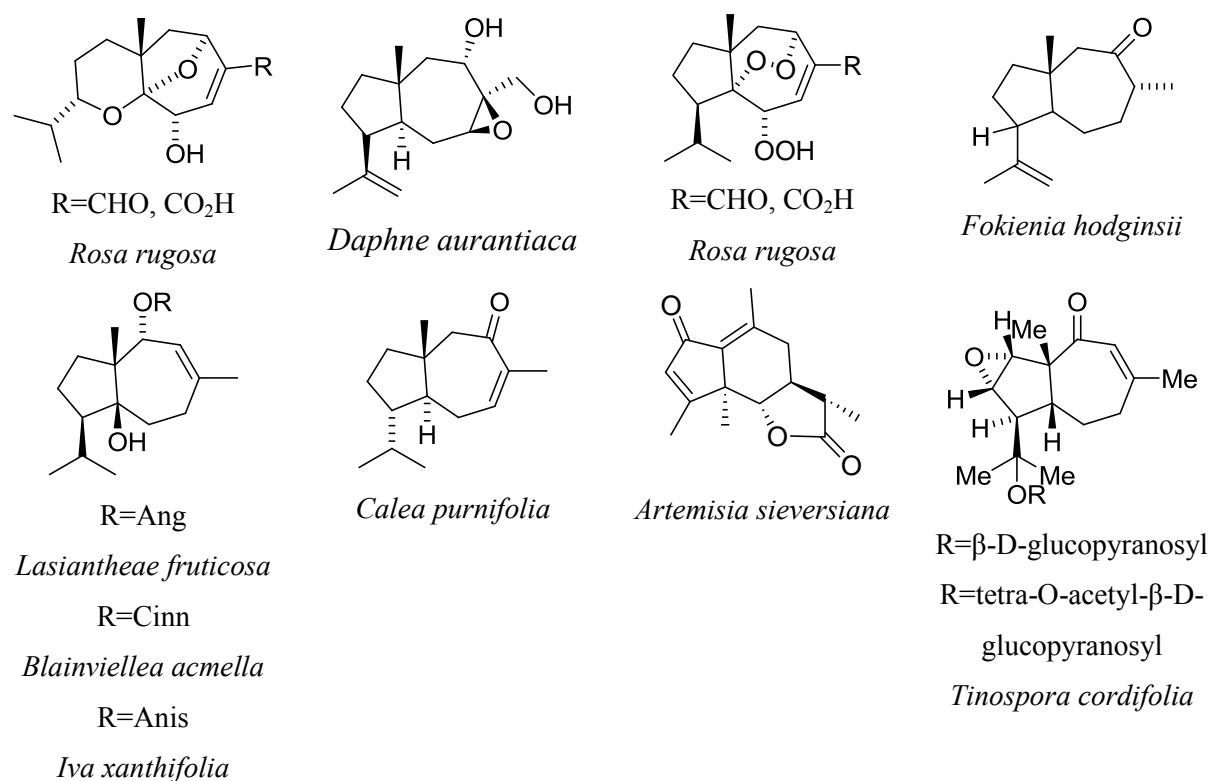
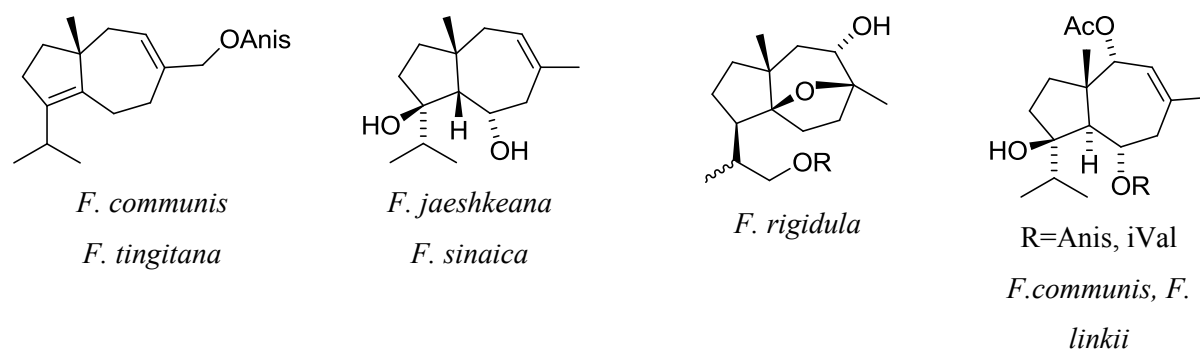
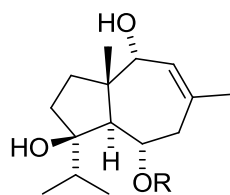


Figure 12 : Structures de daucanes sesquiterpènes isolées de différentes sources.

I.2.3.1.3 Sesquiterpènes de *Ferula*

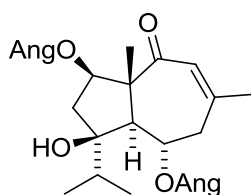
Le genre *Ferula* L est bien exploité au niveau des études phytochimiques et biologiques vue sa richesse en phyto-œstrogènes de type daucanes sesquiterpénoïdes. Une cinquantaine de structures a été isolée et identifiée du genre *Ferula* L jusqu'à l'année 1994 et une dizaine de structures récentes a fait l'objet d'études phytochimiques. La Figure 13 montre quelques exemples de structures de daucanes sesquiterpènes isolés à partir du genre *Ferula* L (Ghisalberti EL, 1994).



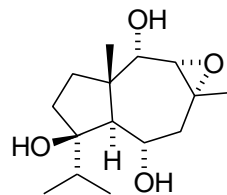


R=H, Anis, 2-MeBu,
Ang

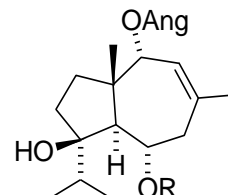
F. latipina, *F. communis*,
F. linkii



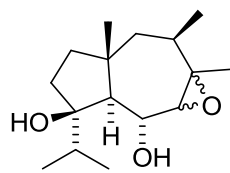
F. sinaica



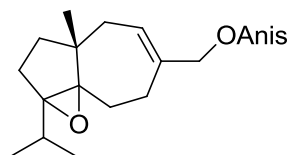
F. latipina



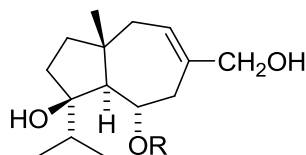
R=Ang, Benz, Anis
F. communis



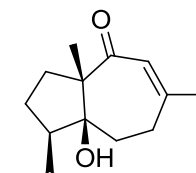
F. jaeshkeana



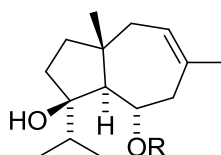
F. communis



F. jaeshkeana



F. communis



R= Ang
F. communis

R=benz
F. elaechytis

R=3-hydroxy-4-
methoxybenzoyl
F. tenuisecta

R=Val
F. linkii

R= *p*-hydroxybenzoyl
F. communis
F. elaechytis
F. orientalis

R=3,4,5-
trimethoxybenzoyl
F. pallida

R= Cinn
F. rigidula

R=2-hydroxybenzoyl
F. elaechytis

R= coum
F. rigidula

R=Van
F. orientalis

R= Anis
F. linkii

R= 3,4-
dihydroxybenzoyl
F. akistschkensis

R=Ver
F. clinkii

R=3,4-
methylenedioxybenzoyl
F. jaeshkean

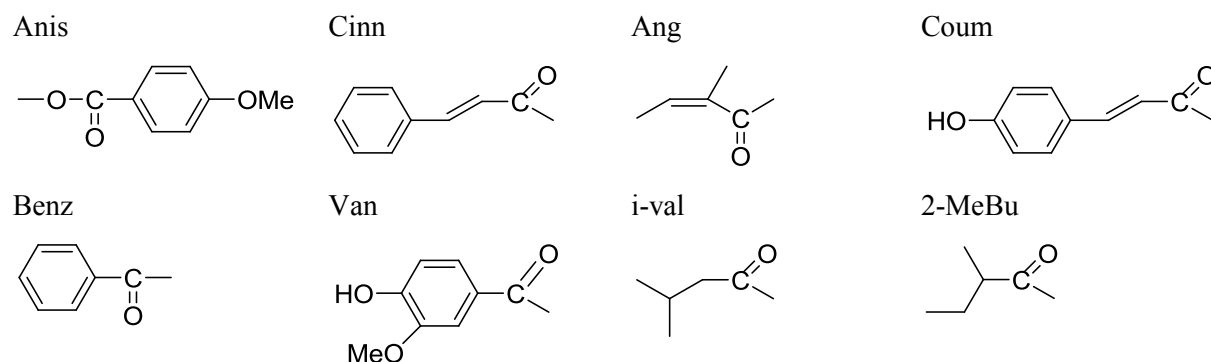
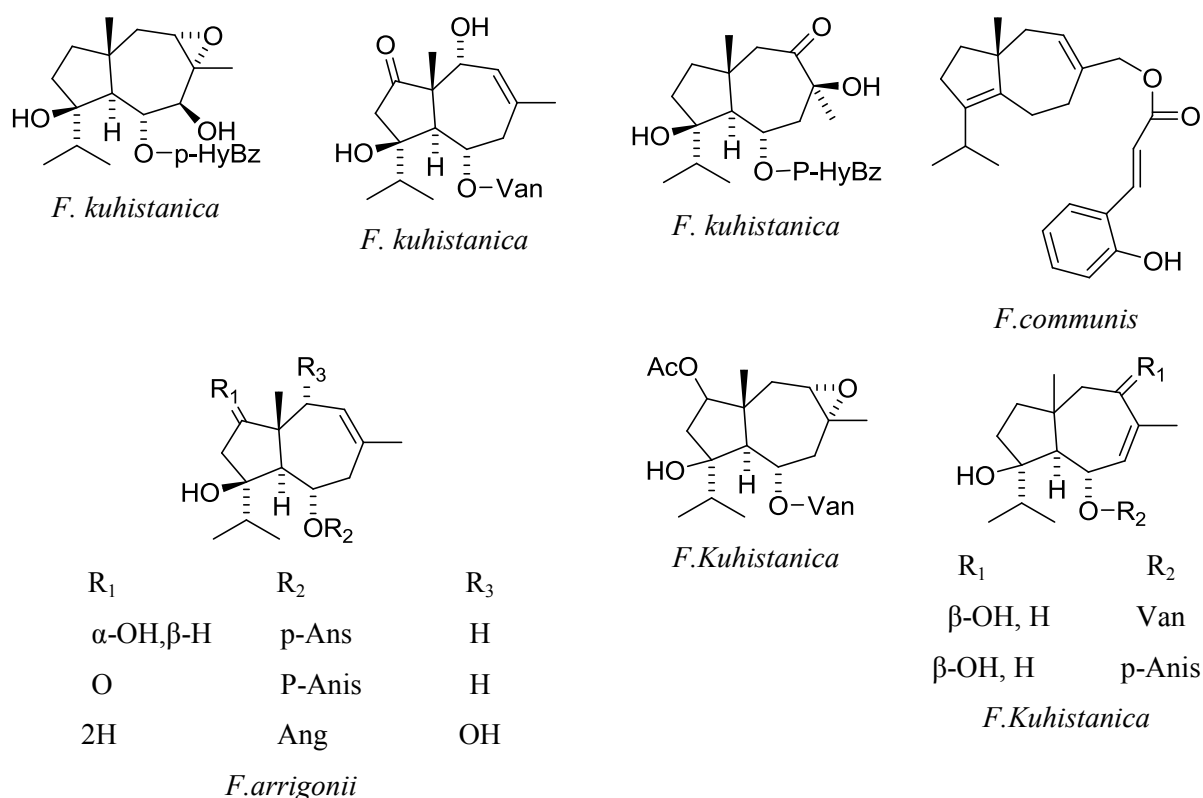


Figure 13 : Quelques structures de daucanes sesquiterpènes isolées du genre *Ferula L.*

Des études phytochimiques récentes ont permis l'identification de structures plus complexes de daucanes sesquiterpènes, quelques exemples sont représentés dans la Figure 14 (Appendino G *et al.*, 1997 ; Al-Yahya MA *et al.*, 1998 ; Chen B *et al.*, 2000 ; Tamemoto K *et al.*, 2001 ; Oughlissi-Dehak K *et al.*, 2008). En effet, ces structures apparentées sont présentes dans le genre *Ferula L* et sont spécifiques à chaque espèce. A noter que les mêmes daucanes peuvent coexister dans plusieurs espèces de *Ferula L*.



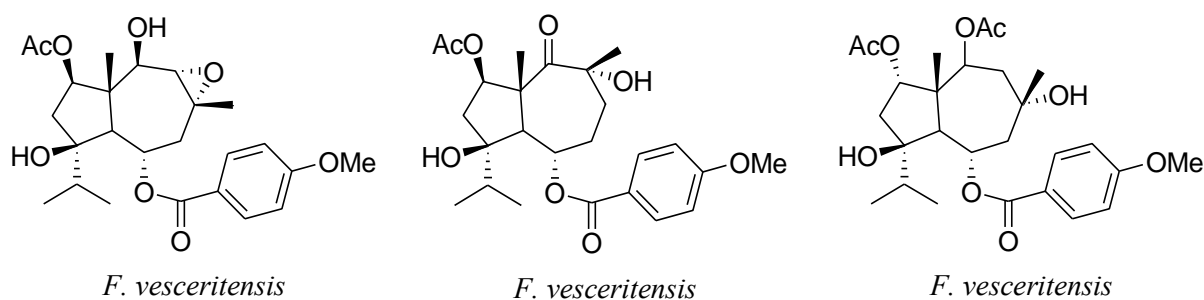


Figure 14 : Structures récentes de quelques daucanes sesquiterpènes isolées de *Ferula L.*

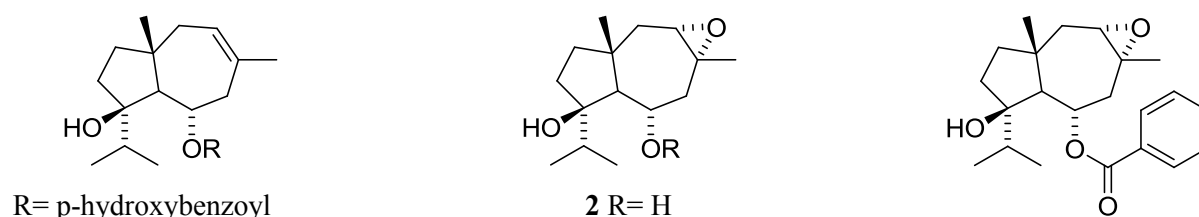
I.2.3.1.4 Sesquiterpènes de *F. hermonis*

Les études phytochimiques sur *F. hermonis* révèlent la présence de différents sesquiterpènes, majoritairement de type daucane. Ces dérivés, même s'ils ont déjà été isolés dans d'autres espèces du genre *Ferula*, seront mentionnés par la suite puisqu'ils représentent les composés majeurs de l'espèce *F. hermonis*.

La fraction dichlorométhane de l'extrait brut des racines de *F. hermonis* contient majoritairement le *p*-hydroxybenzoate (férutinine) et le benzoate de jaeschkenadiol (1a) (52 % et 30 % respectivement). Les aryl esters du jaeschkenadiol, le 2,3-époxyde jaeschkenadiol (2), le 2,3- α -époxyjaeschkenadiol 5-benzoate (3) (Diab Y. *et al.*, 2001a), ainsi que l' α -bisabolol sont aussi présents en faible quantité (Diab Y *et al.*, 2001b) (Figure 15).

D'autres daucanes esters sont isolés à partir des racines de la plante, ce sont le 14-(4'-hydroxybenzoyloxy)dauc-4,8-diene (4), le 14-(4'-hydroxy-3'-methoxybenzoyloxy)dauc-4,8-diene (4a) (Galal AM *et al.*, 2001), le (1R,4R)-4-hydroxydauca-7-ene-6-one (5), (1R,4R)-4-hydroxydauca-7-ene-6,9-dione (5a), le (1R,3S,8S)-3-éthoxy-8-angeloyloxydauca-4-en-9-one (6) (Lhuiler A *et al.*, 2005) et le (1R, 3aR, 6R, 8S)-8-(4-hydroxyphenoxy)-1-isopropyl-3a,6-diméthyl-1,2,3,3a,6,7,8,8a-octahydroazulène-1,6-diol (7) (Ibraheim ZZ *et al.*, 2011) (Figure 15).

L'étude menée sur les graines de *F. hermonis* a permis l'identification de trois produits nommés Feruhermonis **A-C** : le 4 β -hydroxy-6 α -benzoyl-7-daucen-9-one (**A**, 8), le 4 β , 8 β -dihydroxy-6 α -benzoyl-dauc-9-ene (**B**, 9) et le 4 β , 9 α -dihydroxy-6 α -benzoyl-dauc-7-ene (**C**, 10) (Auzzi AA *et al.*, 2008) (Figure 15).



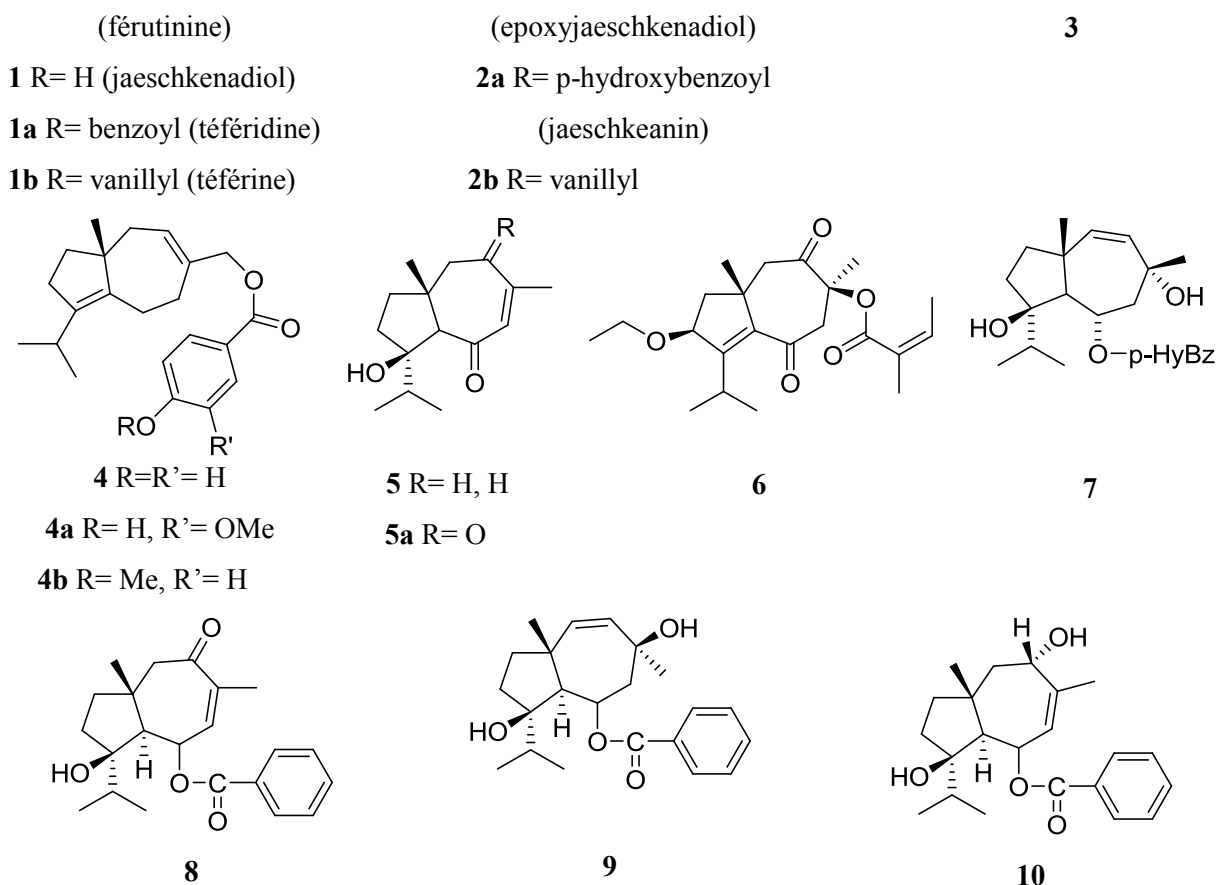


Figure 15 : Daucanes esters de *F. hermonis*.

I.2.3.2 Le sesquiterpène d'intérêt : la férutinine

Les études phytochimiques ont permis l'identification d'un composé majeur (52 %) purifié directement à partir d'un extrait brut de *F. hermonis*, la férutinine (Diab Y *et al.*, 2001a). Ce composé est présent aussi à des concentrations variables dans d'autres espèces du genre *Ferula* (Tableau 9).

Tableau 9 : La férutinine dans les différentes espèces de *Ferula*.

Composé	Source	Référence
Ferutinine	<i>F. hermonis</i>	(Galal AM <i>et al.</i> , 2001)
	<i>F. akitschkensis</i> , <i>F. communis</i> , <i>F. elaeochytris</i> , <i>F. jaeschkeana</i> , <i>F. kuhistanica</i> , <i>F. lancerottensis</i> , <i>F. linkii</i> , <i>F. orientalis</i> , <i>F. ovina</i> , <i>F. soongorica</i>	

La Ferutinine est un dérivé sesquiterpénique de type daucane ester. C'est le *p*-hydroxybenzoyl ester du jaeschkenadiol (Figure 16).

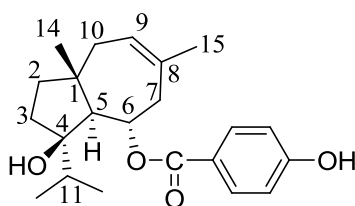
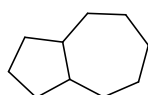


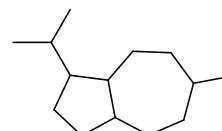
Figure 16 : Structure numérotée de la férutinine.

I.2.3.3 Approches synthétiques

Les sesquiterpènes possédant le motif bicyclo [5.3.0] decane ainsi que les daucanes comprenant un motif isopropyl sur le pentacycle, qui en constituent un sous-groupe, ont fait l'objet de différentes approches synthétiques (Foley DA *et al.*, 2010 ; Bennet NB et Stoltz BM, 2013 ; Foley DA *et al.*, 2013).

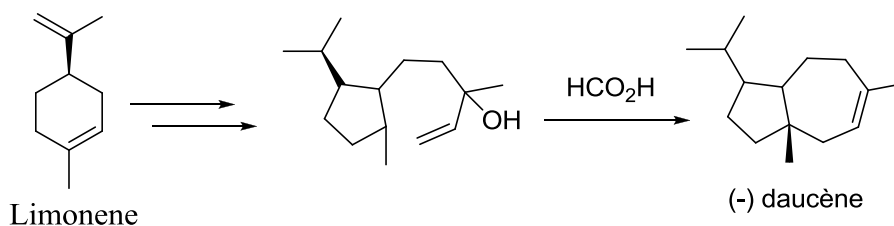


Bicyclo [5.3.0] decane

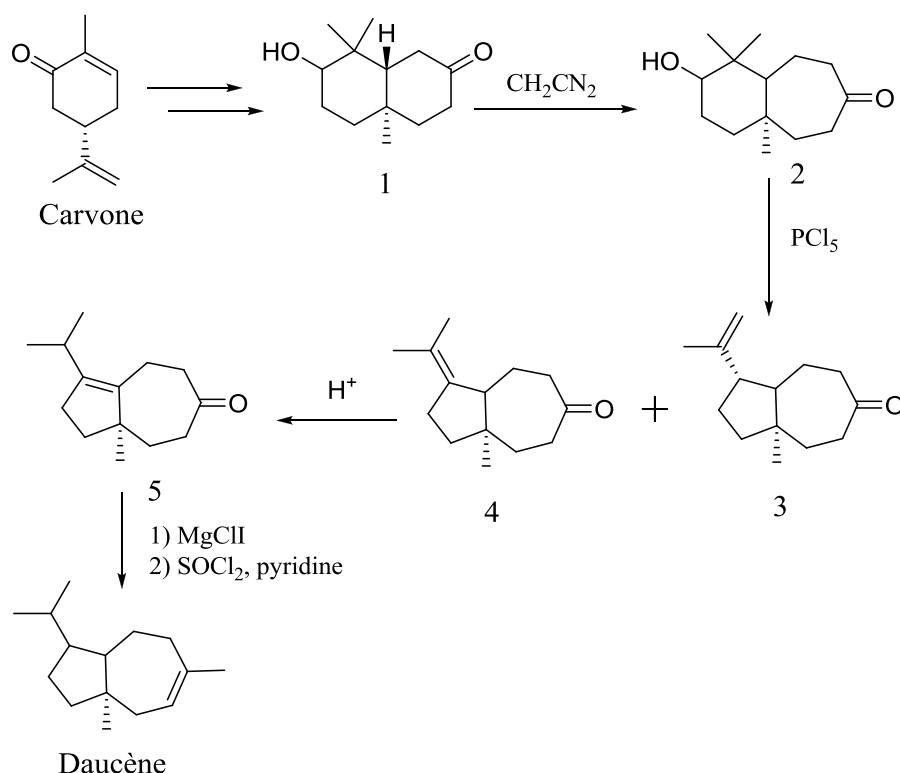


Daucane

On peut notamment citer le daucène, dont la première synthèse énantiosélective reportée par Yamasaki M a permis en partant du (R). (+) -limonène d'aboutir au (-) daucène (Yamasaki M, 1972 ; Foley DA *et al.*, 2010).



Une autre voie de synthèse décrite la même année par Naegeli P *et al* part elle, de la carvone qui est tout d'abord transformée en composé bicyclique 1 selon une procédure précédemment décrite (Naegeli P et Kaiser R, 1972 ; Levisalles J et Rudler CM, 1970).



L'expansion de cycle pour aboutir au composé 2 se fait par action du diazométhane. La déshydratation de ce composé, après réarrangement conduit au mélange de deux dérivés 3 et 4 qui sont séparés par chromatographie. La migration de la double liaison de 4 pour donner 5 se fait par catalyse acide. La fonction cétone de ce dernier composé est transformée en alcool qui est ensuite déshydraté pour donner le daucène.

Concernant la férutinine, aucune synthèse totale n'a été reportée à ce jour.

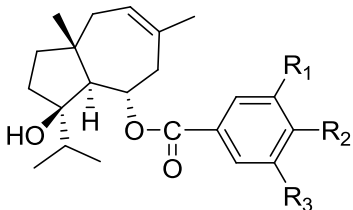
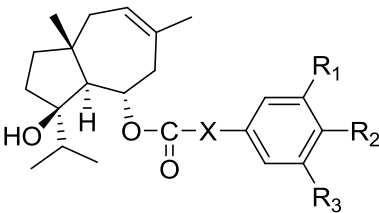
I.2.4 Relations structures-activités

Les relations structures-activités ont pour but d'identifier les fonctions des molécules cruciales pour observer des effets biologiques. Peu d'études ont été menées sur les activités œstrogénique et cytotoxique et juste sur la férutinine. Les analogues étudiés sont soit issus de sources naturelles, soit obtenus par hémisynthèse. Quelques points importants ont néanmoins pu être dégagés.

I.2.4.1 Activité œstrogénique

Dans une première étude, Appendino G *et al.*, dans le but d'améliorer l'activité œstrogénique de la férutinine, ont synthétisé la série d'analogues 11a-11n. L'activité œstrogénique de ces composés a été évaluée vis-à-vis du RE humain issu de levures (Appendino G *et al.*, 2002). Les résultats sont reportés dans le Tableau 10 :

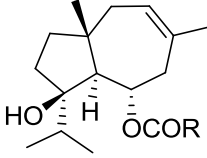
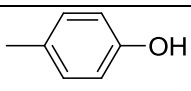
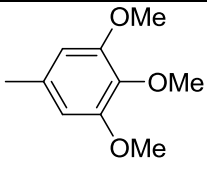
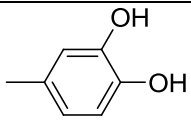
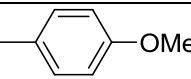
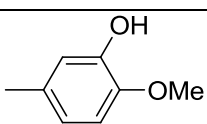
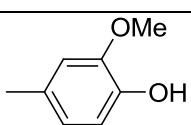
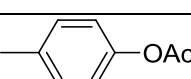
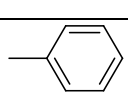
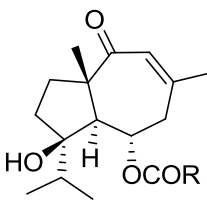
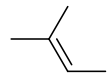
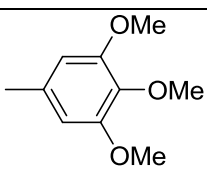
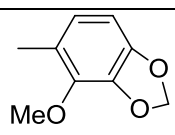
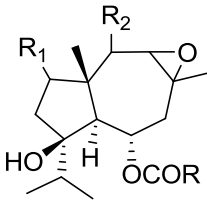
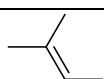
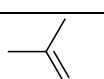
Tableau 10 : Analogues de la férutinine (Appendino G *et al.*, 2002).

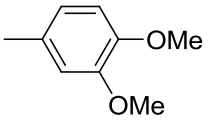
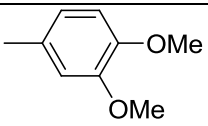
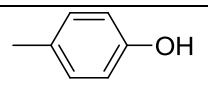
 11			R ₁	R ₂	R ₃	EC ₅₀ relative à l'œstradiol
	Férutinine		H	OH	H	0,5
	11a		H	OMe	H	<0,0001
	11b		H	OAc	H	0.2
	11c		H	H	H	Inactif
	11d		H	OH	OH	<0,1
	11e		H	OH	OMe	Inactif
	11f		OMe	OMe	OMe	Inactif
	X		R ₁	R ₂	R ₃	EC ₅₀ relative à l'œstradiol
	CH ₂	11g	H	OH	H	<0,0001
		11h	H	OH	OMe	Inactif
	CH ₂ -CH ₂	11i	H	OH	H	<0,0001
		11j	H	OH	OH	Inactif
	CH=CH	11k	H	OH	H	<0,0001
		11l	H	OH	OH	Inactif
		11m	H	OH	OMe	Inactif
		11n	OMe	OH	OMe	Inactif

EC₅₀ : Dose effective

La férutinine restant le composé le plus actif tandis que le jaeschkenadiol est inactif, ils concluent à l'importance d'un groupement *p*-hydroxybenzoyle (Appendino *et al.*, 2002). Ce résultat est d'ailleurs confirmé quelques années plus tard par l'équipe de Nazrullaev SS *et al.*, qui a réalisé un travail analogue à partir d'esters de sesquiterpènes à la fois aliphatiques ou aromatiques isolés de la plante du genre *Ferula* (Nazrullaev SS *et al.*, 2008). Dans cette étude, les aliphatiques ne présentent pas d'activité (Tableau 11).

Tableau 11 : Analogues de la férutinine (Nazrullaev SS *et al.*, 2008).

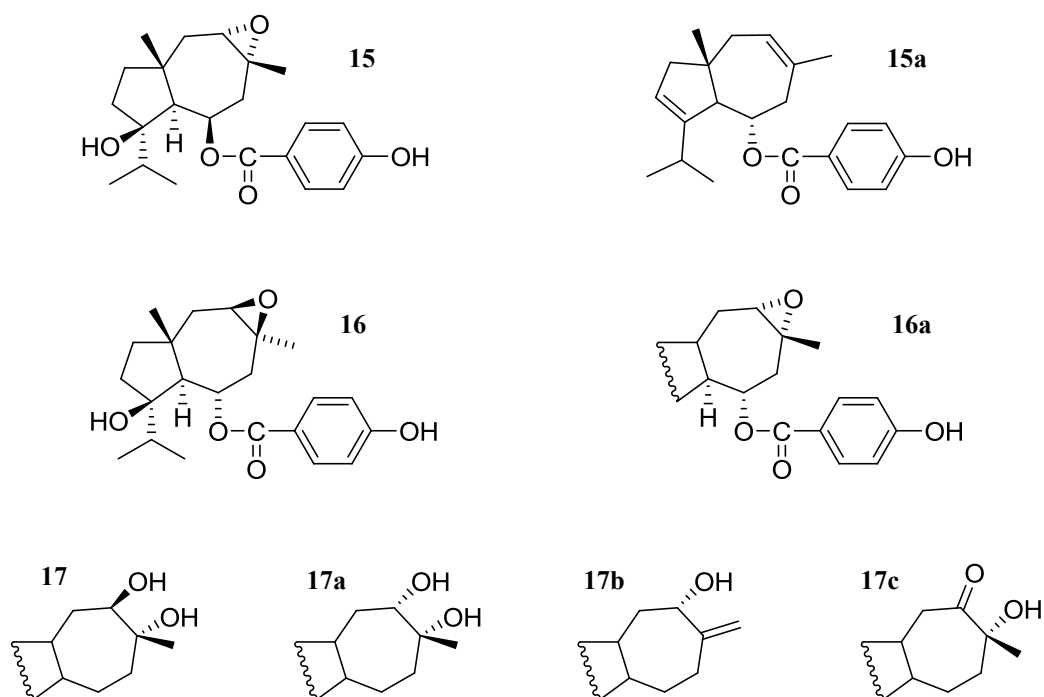
		R			Croissance de l'utérus, % de control	Croissance des ovaires, % de control
 12	Férutinine				359,0±29,1	44,6±7,4
	12a				-15,06±4,3	-5,2±2,6
	12b				141,5±9,9	13,2±3
	12c				198,4±13,8	5,8±1,6
	12d				268,0±12,4	31,2±4,6
	12e				268,9±19,1	46,4±4,2
	12f				273,6±24,2	24,6±7,4
	12g				328,0±16,3	42,2±4,7
 13	13a				-39,5±9,05	-42,5±7,3
	13b				-28,9±11,2	-11,04±4,4
	13c				5,12±5,1	12,6±3,5
		R ₁	R ₂	R		
	14a	H	OAc		-41,2±6,7	-39,2±2,3
	14b	OAc	OAc		-38,4±2,7	-49,14±2,04

14	14c	OAc	OAc		-28,4±12,4	-27,6±4,6
	14d	OAc	H		-19,9±2,7	-41,68±3,3
	14e	H	H		141,5±9,9	13,2±3,0

La fonction hydroxyle sur le cycle phényle, dont la présence est cruciale pour l'activité, joue le rôle d'un **centre donneur/accepteur d'hydrogène** qui facilite la fixation de la molécule dans le site des récepteurs aux œstrogènes.

Nazrullaev SS *et al.* ont évalué la distance entre l'oxygène de l'hydroxyle du *p*-hydroxybenzoyle et celui de l'hydroxyle sur le pentacycle pour les différents composés. La distance de 10,21 Å trouvée pour la férutinine est la plus proche de celle observée entre les deux hydroxyles de l'œstradiol (10,85 Å) (Appendino *et al.*, 2002). Ce résultat va dans le sens des observations d'Appendino G *et al.* qui ont montré que l'homologation ou la vinylation de la fonction ester de la férutinine était préjudiciable à son activité (Nazrullaev SS *et al.*, 2008).

Dans un travail reporté deux années plus tard, Appendino G *et al.* s'intéressent à une autre série d'analogues obtenus par hémisynthèse et modifiés au niveau de différentes fonctions de la férutinine (Figure 17) (Appendino G *et al.*, 2004).



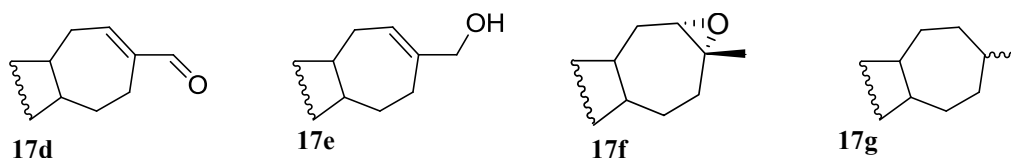


Figure 17 : Analogues de la férutinine (Appendino G *et al.*, 2004).

- Le composé 15a, ne comportant pas de fonction hydroxyle au niveau du pentacycle conserve une activité œstrogénique, suggérant que la fonction hydroxyle en 4 et la liaison hydrogène qu'elle fait avec le carbonyle de l'ester dans le cas de la férutinine n'est pas indispensable à l'activité.
- De l'oxydation de la double liaison en C8/C9 en époxyde n'a pas résulté une perte d'activité, ce qui a été le cas quand cette réaction conduit à des composés comportant un hydroxyle sur la face alpha (α) de la molécule (glycol, céto).
- Il semble de plus, que la configuration du carbone C6 de la molécule soit importante car si on la change, on perd complètement l'activité (composé 15/16a).

I.2.4.2 Activité cytotoxique

La première publication faisant état d'activités antiprolifératives pour des composés de la famille de la férutinine a été reportée par Lhuiler A *et al.* en 2005. Ainsi trois composés 18-20 et la férutinine ont été testés vis-à-vis de la prolifération des cellules MCF7 (cellules cancéreuses du sein humain) (Figure 18).

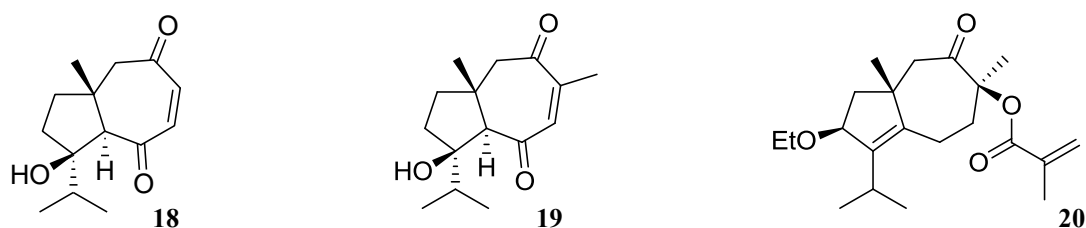


Figure 18 : Composés analogues de la férutinine issus de *F. hermonis*

La férutinine a montré un effet biphasique : prolifératif à basses concentrations et antiprolifératif à hautes concentrations, sans doute dû à son effet anti-œstrogénique comme ça a été observé chez différents daucanes (Appendino *et al.*, 2004). Des trois autres composés testés, seul le composé 19 s'est révélé avoir un caractère antiprolifératif (Lhuiler A *et al.*, 2005).

Dans un travail plus récent, deux nouveaux daucanes 21 et 22 ont été décrits par AlKhatib R *et al.* associés à une activité antiproliférative sur des cellules cancéreuses

leucémiques en comparaison avec la férutinine. Le composé 21 s'est révélé le plus actif. Le fait que le composé 22 est moins actif que la férutinine incite à penser que la double liaison C8/C9, comme ça a été observé dans le cas de l'activité anti-œstrogénique, est cruciale pour l'activité cytotoxique (AlKhatib R *et al.*, 2008) (Figure 19).

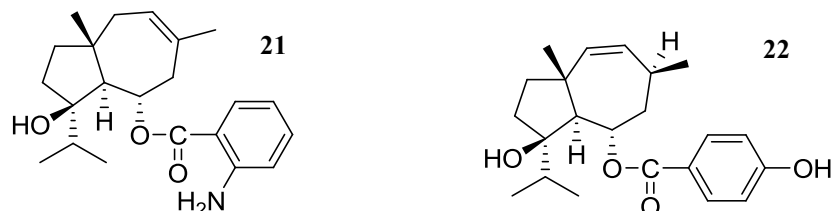
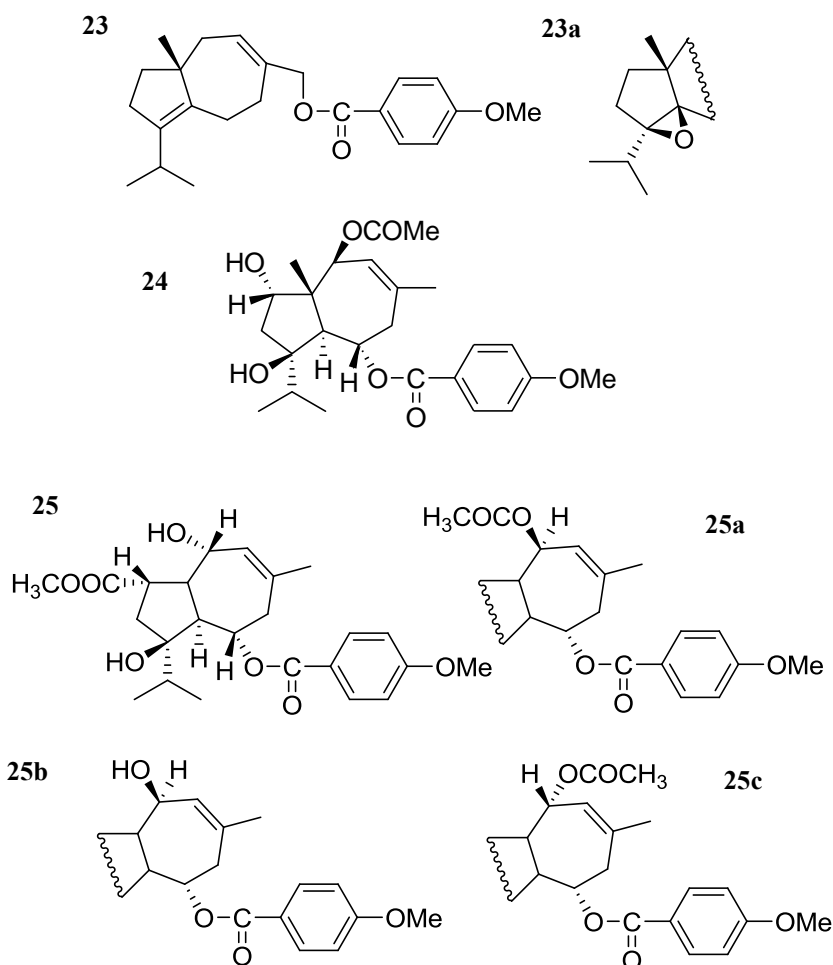


Figure 19 : Composés analogues de la férutinine issus de *Ferula* (AlKhatib R *et al.*, 2008).

Enfin, Dall'Acqua *et al.*, ont testé différents daucanes sesquiterpènes déjà décrits dont la férutinine ainsi que deux nouveaux composés, tous isolés par eux des plantes du genre *Ferula*, sur différentes lignées cellulaires issues de différents cancers (Figure 20) (Dall'Acqua S *et al.*, 2011).



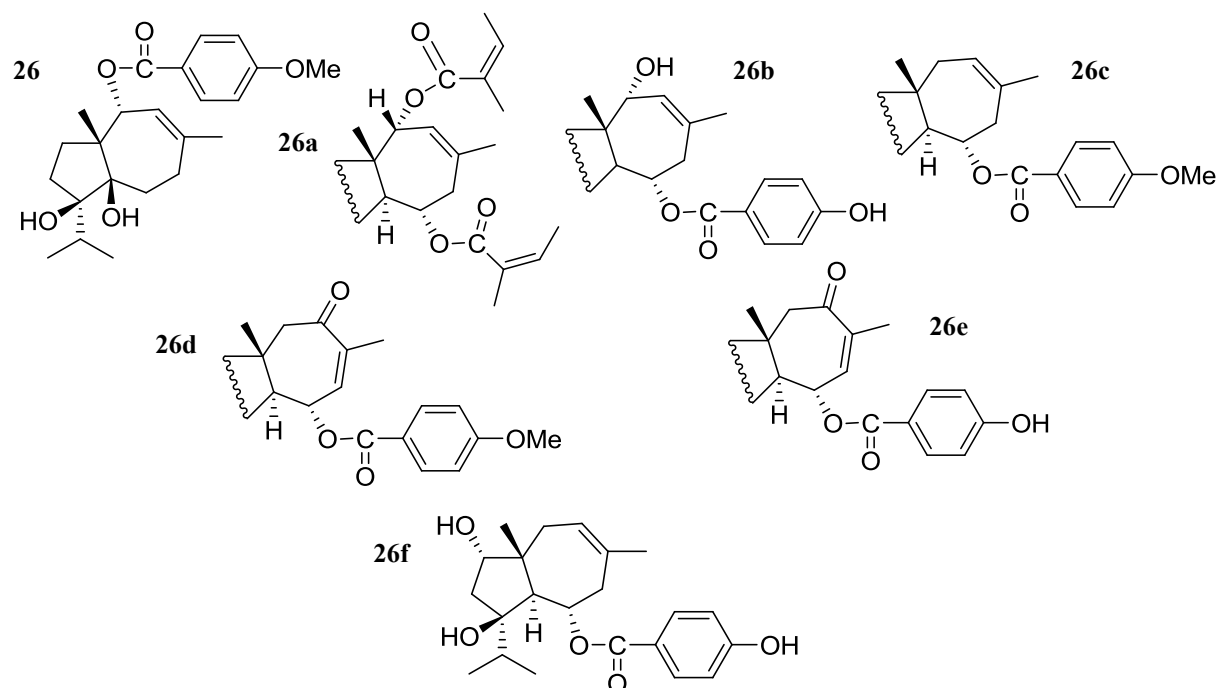


Figure 20 : Composés analogues de la férutinine issus de *Ferula* (Dall'Acqua S *et al.*, 2011).

Les résultats sont reportés dans le Tableau 12 :

Tableau 12 : Activités cytotoxiques de la férutinine et ses analogues sur les différentes lignées cellulaires.

Composé	CI ₅₀ (μM)						
	Hela	A549	HL60	Jurkat	K562	RS4 ; 11	SEM
Férutinine	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
23	>100	>100	30,7±6,2	25,6±7,4	67,0±6,5	44,1±4,0	25,5±1,6
23a	>100	>100	>100	>100	>100	60,9±1,8	84,0±9,5
24	52,6±1,8	>100	14,9±5,0	9,1±4,1	70,4±6,2	26,8±4,4	26,5±1,9
25	>100	>100	24,0±4,2	33,6±5,5	85,2±7,9	70,4±4,3	>100
25a	52,9±2,6	79,6±0,7	23,0±0,9	5,9±3,4	48,2±7,7	34,4±2,1	18,1±3,0
25b	14,5±3,9	23,3±1,7	11,3±2,4	3,3±0,8	39,6±3,9	8±0,2	15,0±1,3
25c	>100	>100	83,5±9,8	62,2±8,8	>100	42,9±1,2	32,9±2,5
26	>100	>100	>100	>100	>100	>100	23,9±2,4
26a	4,4±0,7	2,8±1,4	2,6±0,4	7,7±1,4	26,5±6,0	1,7±0,3	2,4±0,1
26b	>100	>100	43,4±2,8	55,0±12,8	>100	29,0±3,5	34,7±1,8
26c	>100	31,9±2,7	20,1±1,8	30,5±7,2	67,8±13,7	17,6±1,4	18,2±2,9
26d	29,7±6,8	31,8±4,4	38,9±6,0	40,5±6,5	>100	28,6±3,0	28,4±1,6
26 ^e	26,1±3,3	14,5±8,8	82,5±7,5	40,5±12,1	>100	28,2±2,2	24,4±2,0
26f	56,5±15,5	83,7±10,2	3,5±6,5	40,3±4,7	95,0±0,7	33,4±1,8	22,4±1,8

Deux de ces composés (25b et 26a) se sont révélés avoir des activités cytotoxiques intéressantes, cependant la férutinine n'a montré aucune activité vis-à-vis d'aucune lignée.

Les produits sont numérotés par ordre croissant à partir des sesquiterpènes de *Ferula hermonis*.

II Définition d'un filtre *in silico* pour la sélection d'antagonistes potentiels des récepteurs aux œstrogènes

La férutinine constitue un point de départ intéressant pour définir de nouveaux agents anticancéreux dans la mesure où elle possède à la fois une grande affinité vis-à-vis des récepteurs aux œstrogènes et des activités antiprolifératives sur des lignées cellulaires cancéreuses hormono-dépendantes. A ce jour, elle n'est pas utilisée en thérapeutique du fait de deux problématiques essentielles : *i*) même si son affinité vis-à-vis des REs est plus importante que celle du tamoxifène, elle ne présente pas une activité purement antagoniste et *ii*) les activités antiprolifératives de la molécule vis-à-vis des lignées hormono-dépendantes sont considérées comme moyenne (CI_{50} de l'ordre de 38 μ M, valeur confirmée dans cet étude). Comme l'amélioration de son pouvoir cytotoxique peut être corrélée à la potentialisation de son pouvoir antagoniste, une étude *in silico* des interactions de la férutinine vis-à-vis des récepteurs aux œstrogènes a été menée afin de designer des analogues potentiellement plus actifs.

L'approche *in silico* qui utilisera une méthodologie d'arrimage (docking) moléculaire s'intéresse aux rapports entre la structure des molécules et leur affinité. Cette dernière est calculée sous différentes formes (énergies de liaison, scores de docking, descripteurs ...) et ultérieurement comparée à des données expérimentales (constantes d'association-dissociation, constante d'inhibition, pourcentages d'inhibition, ...) de manière à définir des relations structure-fonction. Lorsque les données expérimentales ne sont pas disponibles, ces affinités théoriques amènent tout de même des informations, en terme de conception de molécules (inhibiteurs, antagonistes, ...) ou dans la compréhension des mécanismes structuraux, mettant en jeu le récepteur et le ligand, au niveau moléculaire. A ce stade, l'approche réalisée, reste totalement prédictive quant à l'efficacité d'analogues de la férutinine, puisque *i*) les données structurales complètes sur la molécule et *ii*) les données expérimentales directes (par exemple des constantes de dissociation obtenues par une méthode biophysique) par rapport au processus d'association, ne sont pas disponibles. En effet, l'absence d'une structure du complexe RE-férutinine obtenue par cristallographie de rayons X ou par la résonance magnétique nucléaire (RMN), rend ce travail préliminaire et théorique.

Pour autant, les méthodes d'arrimage moléculaire et les informations structurales disponibles ont été combinées, de manière à améliorer les capacités d'analyse et à pouvoir

émettre des hypothèses pour lesquelles les molécules sont susceptibles d'interagir plus favorablement. Il s'agit d'une modélisation qui deviendra multimodale car elle intégrera à la fois des calculs et des données biologiques qui guideront *i)* les contraintes imposées aux calculs et *ii)* l'analyse des résultats. Pour cela, une démarche constituée de deux étapes importantes a été mise en place :

- une étude structurale complète sur l'ensemble des données cristallographiques du RE α et du RE β avec leurs ligands, dans le but d'accéder à une vue plus réaliste du site de liaison de ces récepteurs ainsi qu'aux modalités de liaison,
- une étude d'arrimage moléculaire, où une mise au point d'un système de filtrage post-docking adapté aux REs a été réalisée. Un arrimage de la férutinine dans les deux types des REs a été accompli dans le but de générer des descripteurs qualitatifs, le moins subjectifs possibles, en terme d'affinité. Ceci a permis d'orienter la synthèse d'analogues et/ou de justifier le choix d'une ligandothèque focalisée, conçue sur les bases issues de l'arrimage de la férutinine et de composés (ligands co-cristallographiés) utilisés en tant qu'étalons.

La validation du système nécessite une confrontation des descripteurs issus des calculs aux résultats biologiques. Si une corrélation positive (ou une correspondance) est observée, le système de calcul utilisé sera donc validé et une voie de conception rationnelle des molécules sera donc trouvée. En tenant compte de l'importance des REs dans le sujet actuel, disposer d'un tel outil sera certainement intéressant pour le criblage virtuel et la conception de nouveaux dérivés de la férutinine.

Ce chapitre est divisé en différentes parties qui correspondent à la séquence naturelle des opérations associées à ce type d'étude. En premier, le contexte biologique est posé. Il est suivi d'une analyse structurale dont l'objectif est de rationaliser les connaissances existantes, et *in fine* de fournir une ou plusieurs structures 3D de récepteurs, utilisables par la troisième phase des calculs d'arrimage moléculaire. Enfin la dernière partie sera sous la forme d'une discussion qui permettra de faire le bilan de l'étude et de dresser des lignes directrices pour la synthèse de nouveaux composés.

Malgré le côté rationnel de cette séquence, il ne faut pas perdre de vue que certains composés pourront être choisis en fonction d'autres raisons telles que : la facilité de synthèse, les convictions du chimiste, la difficulté d'étude par des méthodes d'arrimage (par exemple, composés nécessitant une adaptation induite importante de la protéine pour la liaison).

II.1 Outils et formats de données

En ce qui concerne les formats des données, les connaissances sur les relations structure-activité publiées dans la littérature et des structures 3D de protéines issues de la banque de données PDB (*Protein Data Bank*) ont été utilisées. En ce qui concerne les outils logiciels, des programmes de visualisation moléculaires avancés, des systèmes d'alignement structuraux (pour comparer les structures de récepteurs, des outils d'arrimage moléculaire 'docking et scoring' et pour évaluer théoriquement l'affinité de nouveaux antagonistes vis-à-vis des récepteurs, ont été utilisés.

Il s'agit d'une approche intégrée qui combine différents moyens qui prend en considération :

- la manipulation des objets aussi différents que des macromolécules ou des composés organiques, des complexes protéines-ligand existants ou nouvellement créés avant le calcul,
- La détermination de paramètres des calculs sous forme de scripts ou encore regrouper les résultats de calculs sous forme de rapports de synthèse.

Donc autant de tâches différentes qui ne peuvent pas être traitées par un seul logiciel. Ce travail est également compliqué par l'existence de différents formats de données en fonction de chaque logiciel ou domaine scientifique. Le Tableau 13 suivant résume l'essentiel des formats qui a été utilisé dans l'étude (dans la suite du texte les références à ces formats de fichiers se feront en utilisant l'acronyme du format).

Tableau 13 : Acronymes (colonne Format) des principaux formats de fichiers utilisés.

Format	Utilisation	Référence et documentation
PDB	Macromolécules, ligands, complexes	Protein Data Bank http://www.pdb.org
MOL	ligand (1 molécule, 2D-3D)	MDL Molfile (MDL Informations Systems, Symyx, Accelrys)
SDF	ligands (n molécules, 2D-3D)	Intègre plusieurs molécules au format MOL
MOL2	ligands (1... n molécules, 2D-3D)	SYBYL (Tripos) http://www.tripos.com/tripos_resources/fileroot/pdfs/mol2_format.pdf
MVDML	Complexes	Format natif Molegro pour l'écriture d'un système (protéine, ligand, contraintes, templates, ...) utilisable pour l'arrimage moléculaire.

PY, PYC	ligands, complexes (n molécules 3D)	PYTHON Utilisable dans UCSF (<i>University of California San Francisco</i>) Chimera
MRV	ligands (2D)	Format ChemAxon pour le dessin de formules développées. http://www.chemaxon.com/marvin/help/formats/mrv-doc.html

Ce type d'approche *in silico* fait aussi intervenir différents outils annexes, généralement non décrits mais qui sont importants par exemple :

- un convertisseur de formats chimiques tel qu'OpenBabel (*open source chemistry toolbox*),
- un éditeur de texte ASCII tel que SciTE (*Scintilla Text Editor*) qui permet de modifier dans le texte des fichiers de coordonnées structurales (ligands ou macromolécules) lorsque les autres programmes échouent.

II.2 Les récepteurs aux œstrogènes nucléaires : RE α et RE β

Les REs sont des récepteurs nucléaires. Ce sont des facteurs de transcription, médiateurs des hormones œstrogéniques. Il en existe deux types : le RE α et le RE β . Le RE α est une protéine de 66 kDa (595 acides aminés) et le RE β une protéine d'environ 60 kDa (530 acides aminés). Pour ces deux récepteurs, des variantes résultant d'un épissage alternatif ont été identifiés. Ces récepteurs présentent une structure générale commune à tous les récepteurs nucléaires (Figure 21) et possèdent une homologie de séquence importante que l'on peut décomposer en cinq domaines (A-F) (voir chapitre 1 ; Krust A *et al.*, 1986).

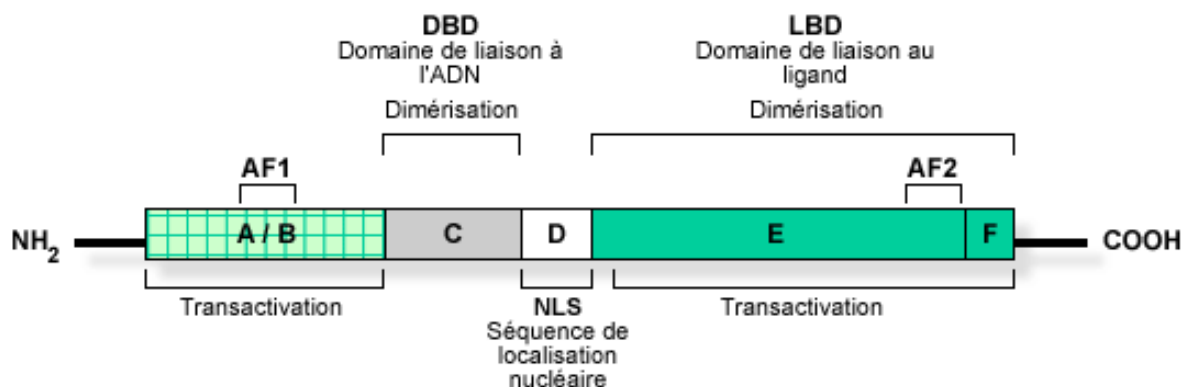


Figure 21 : Structure commune aux récepteurs nucléaires (Krust A *et al.*, 1986).

Chaque domaine joue un rôle essentiel participant à la fonction biologique de la protéine. En particulier, l'œstrogène exerce ses effets en se liant à son récepteur entraînant la dimérisation de ce dernier avant sa translocation dans le noyau et le déclenchement de la transcription des gènes cibles. Le schéma général de fixation du ligand naturel dans son site peut être représenté de la façon suivante (Figure 22) :

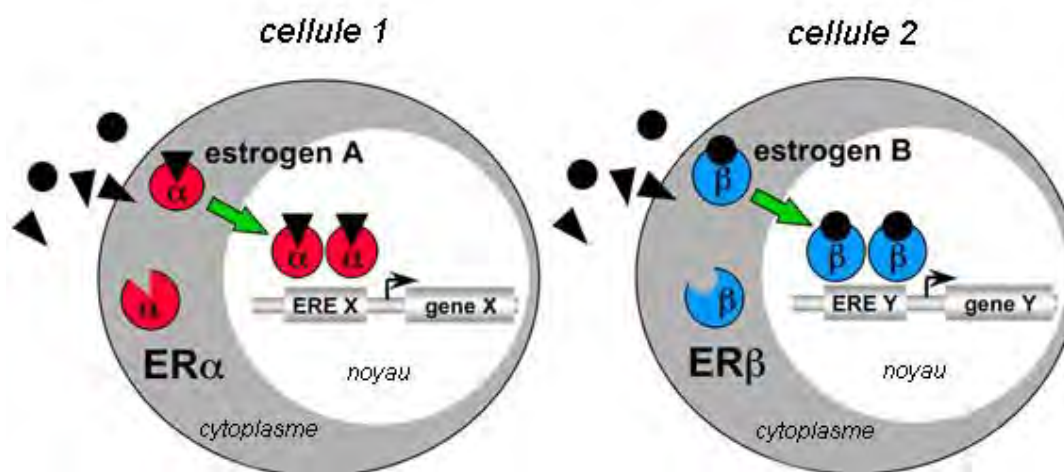


Figure 22 : Fixation, dimérisation et translocation du complexe œstrogène-récepteurs dans la cellule (Krust A *et al.*, 1986).

Parmi ces domaines (Figure 21), on s'intéressera donc essentiellement au domaine E/F ou au domaine LBD. Ce domaine permet la liaison au ligand et la dimérisation et contient le domaine AF2 essentiel à la transactivation dépendante de la fixation du ligand.

Le domaine de liaison du ligand est conservé à 54 % entre le REα et le REβ. Ces deux récepteurs possèdent de ce fait de nombreux ligands communs.

Le domaine E permet la reconnaissance de l'hormone et assure la sélectivité de la réponse physiologique. Cette région est impliquée dans l'association avec la protéine chaperonne Hsp90 (Segnitz B et Gehring V, 1995), la dimérisation du récepteur (Kuyl CW, 1995) et l'interaction avec les coactivateurs transcriptionnels (McKenna NJ, 1999).

II.2.1 Relations structure-fonction

D'une manière fonctionnelle, le LBD est la seule partie qui est sous la contrainte directe du ligand. En 1997, Brzozowski *et al* ont publié les premières structures cristallines du domaine de liaison au ligand complexé avec l'œstrogène endogène (œstradiol) (Brzozowski AM *et al.*, 1997). Ceci a permis d'établir progressivement des hypothèses concernant le processus de formation du complexe récepteur-ligand. En 2012, la PDB contenait une

quarantaine de structures du RE α qui permet d'avoir une idée assez précise des relations structures fonction.

D'une manière générale, ces protéines sont essentiellement structurées autour d'hélices alpha (H1-H12) reliées entre elles par 4 boucles, et présentent une architecture très conservée dans la famille, autant au niveau du squelette protéique «backbone» que de chaînes latérales des acides aminés. L'hélice H12 est sur l'extrémité C-terminale, à proximité du site de liaison des ligands, elle présente deux conformations principales suite à la fixation du ligand. Selon la position adoptée par l'hélice, l'effet agoniste/antagoniste des ligands varie.

La Figure 23 présente la structure tridimensionnelle du RE α typique, correspondant à l'entrée 1XPC⁴ de la PDB (Blizzard TA *et al.*, 2005) sur laquelle l'hélice H12 a été marquée. La structure 1XPC servira également de structure de référence (les autres récepteurs de la même famille seront alignés sur cette protéine) dans la suite du travail.

Par définition, un agoniste est un composé capable d'induire les mêmes fonctions que le ligand naturel, œstrogène dans ce cas, alors qu'un antagoniste est un composé capable de bloquer l'action des œstrogènes dans les tissus cibles. Structuralement, lors de la liaison d'un agoniste, l'hélice H12 se replie de façon à fermer la poche de liaison du ligand. Le repliement de cette hélice génère une fonction d'activation AF-2 compétente et un motif protéique capable d'interagir avec les co-activateurs transcriptionnels. Lors de la liaison d'un antagoniste, l'hélice H12 ne peut pas se positionner correctement au-dessus de la cavité ce qui empêche la formation d'un domaine AF-2 compétent (Shiau AK *et al.*, 1998).

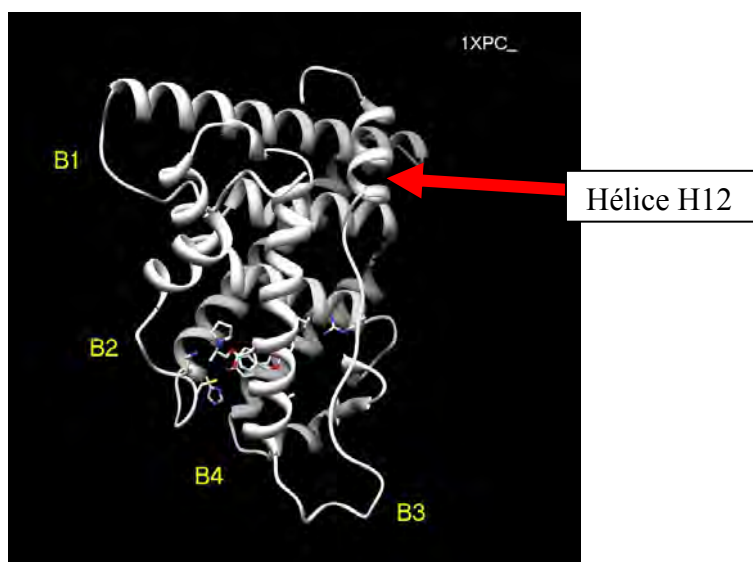


Figure 23 : Structure 1XPC avec un marquage (flèche rouge) de l'hélice H12.

⁴ 1XPC - <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1XPC> - Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (*Homo sapiens*) et d'une résolution de 1,60 Å, la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique.

La Figure 24 présente une structuration de type agoniste (Figure 24, **A**) ou antagoniste (Figure 24, **B**) d'un RE α . Les deux structures ont été alignées dans le même espace de référence, ce qui montre la conservation de l'ensemble des éléments de la protéine, à l'exception de H12.

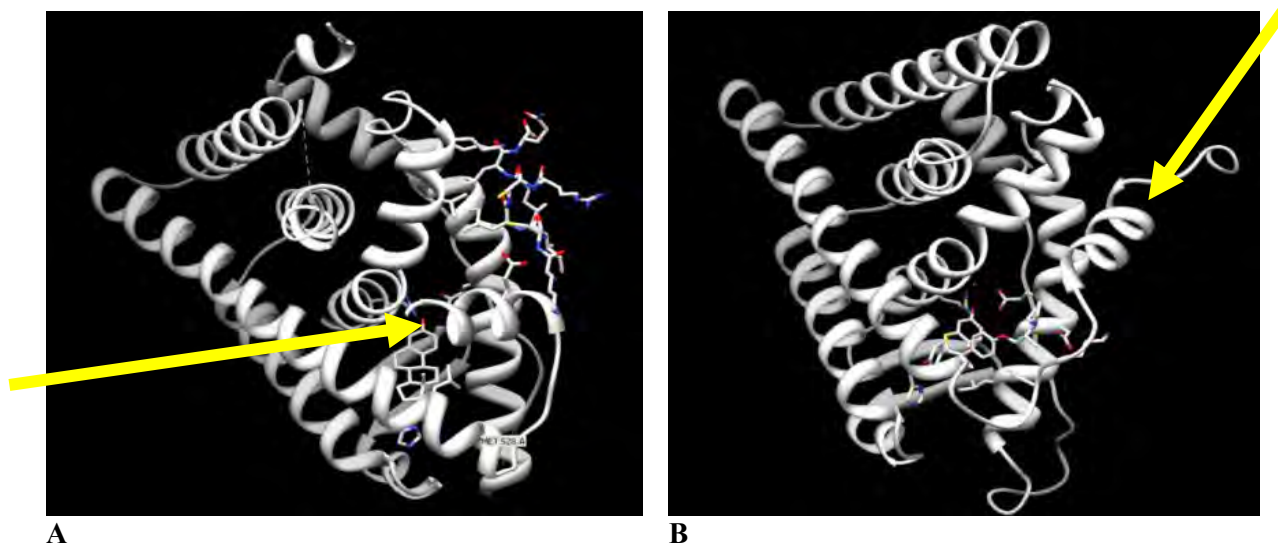


Figure 24 : Structuration de type agoniste ou antagoniste des RE α . (**A**) La protéine en position **agoniste**, l'hélice H12 est repliée sur le ligand permettant son interaction avec les coactivateurs ; (**B**) protéine en position **antagoniste**, l'hélice H12 est repoussée vers l'extérieur. L'axe de l'hélice H12 est marqué par les flèches jaunes.

Sur cette dernière figure, la structure en position agoniste correspond à l'entrée 1G50⁵ (Eiler S *et al.*, 2001) de la PDB, et porte un ligand, l'œstradiol (EST) que l'on distingue dans le site (à l'extrémité de la flèche)⁶. La structure 3ERT⁷ (Shiau AK *et al.*, 1998) de la PDB illustre la position antagoniste de H12, et complexe également un ligand, le OHT (4-hydroxytamoxifène) au même endroit sur la figure.

II.3 Analyse structurale

Les méthodes d'arrimage moléculaire s'appliquent à une protéine, il faut donc disposer d'une structure 3D, si possible complète, d'une protéine ou d'un domaine fonctionnel. Mais lorsque plusieurs structures (plusieurs entrées dans la PDB) sont connues, la question se pose de savoir laquelle choisir.

⁵ **1G50** - <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1G50> – Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (*Homo sapiens*) et d'une résolution de 2,90 Å, la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique.

⁶ Les autres composés organiques (cofacteurs) correspondent à des éléments des solutions de cristallisation que l'on retrouve dans la structure mais qui ne correspondent pas au ligand/substrat d'intérêt.

⁷ **3ERT** - <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3ERT> - Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (*Homo sapiens*) et d'une résolution de 1,90 Å, la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique.

Plusieurs possibilités existent, par exemple choisir la structure la plus complète ou ayant la meilleure résolution. Dans certains cas ces approches ont du sens, mais si une famille de protéines est étudiée, il est plus intéressant d'analyser toutes les structures, de manière à obtenir une structure la plus représentative de l'ensemble de la famille. Si ce n'est pas possible et s'il existe deux ($n = 2$) états (une conformation active et une conformation non active, par exemple), deux structures canoniques représentatives de chaque état seront recherchées. Si plusieurs états existent pour une séquence donnée, n peut être typiquement compris entre 20 et 60 états. Le nombre d'états est fixé en fonction de l'échantillonnage (nombre de frames représentatifs) utilisé pour décrire la dynamique de la protéine obtenue au moyen de différentes méthodes (dynamique moléculaire, modes normaux de protéines, ...). Les calculs d'arrimage moléculaires seront plus précis avec n conformations de protéine correspondant à n état fonctionnels précis, qu'avec une seule structure. Cette procédure (ensemble docking) est cependant coûteuse car les calculs sont multipliés par n . Au-delà de $n = 5$ un calcul intensif est nécessaire et un logiciel d'arrimage permettant d'utiliser des scripts sera d'un grand intérêt. Ce dernier permettra d'automatiser les calculs, mais une interface graphique reste indispensable pour la mise au point des calculs et pour l'analyse des résultats. Dans le cas précis des récepteurs RE α et le RE β , la présence du basculement de l'hélice H12 semble indiquer la présence au moins $n = 2$ états. L'analyse structurale aura donc pour but d'affiner cette constatation de manière à obtenir le nombre de structures canoniques minimales et représentatives de chaque famille protéique RE α et de RE β .

II.3.1 Méthodologie

L'approche, en termes de pratique, est basée sur la recherche et l'exploitation de la structure moléculaire tridimensionnelle des protéines cibles. Il s'agit d'une démarche qui se déroule en plusieurs étapes :

- La recherche des structures cristallisées des protéines publiées dans la littérature. Cela est possible grâce à un répertoire mondial de données appelé PDB qui est d'accès libre sur internet.
- La préparation des structures pour l'étape d'analyse. A ce niveau s'effectue l'identification des chaînes protéiques ainsi que des facteurs qui peuvent être co-cristallisés avec les protéines cibles (cofacteurs, molécules d'eau, ...). Puis on réalise l'alignement de ces structures dans le même espace de coordonnées tridimensionnelles.

- Le regroupement de structures protéiques. Ici nous sommes dans le cas de protéines flexibles où le site semble acquérir une adaptation induite au ligand. Dès lors, selon la position de l'hélice H12, le site de liaison aura différentes topologies. Il faut donc regrouper les différentes structures par rapport à ces éléments structuraux.
- La recherche de structure(s) protéique(s) typique(s). A partir des clusters (groupes) obtenus, une structure représentative du groupe sera retenue et elle sera appelée structure canonique car elle définit ce cluster.

Une fois ce travail réalisé, la collection de structures disponibles dans la PDB sera réduite à n structures canoniques, représentatives de n états conformationnels.

II.3.1.1 Recherche des structures protéiques

La première étape consiste à rechercher les structures protéiques des récepteurs aux œstrogènes disponibles dans la PDB. Ces structures tridimensionnelles sont issues principalement d'analyses par diffraction des rayons X, ou par résonance magnétique nucléaire (RMN).

La fiche de chaque structure dans la PDB comporte des éléments qui permettent de rappeler des protéines voisines (en structure, fonctions). Dans certains cas, les recherches dans la PDB peuvent également être croisées avec d'autres bases de données (généralistes, bibliographiques, enzymologie, tests, ...) telles que Medline ou PubChem.

Les critères de choix peuvent être variés, mais dans la mesure où l'affinité de candidats vis-à-vis d'un récepteur est étudiée, les structures correspondant à des complexes récepteur-ligand (ou enzyme-substrat/inhibiteur) sont favorisées plutôt que celles des protéines seules (type apo-enzyme).

47 structures protéiques pour RE α et 33 structures pour RE β co-cristallisées (ligand-récepteur) ont été sélectionnées. Leurs codes PDB apparaissent dans le Tableau A-1 et A-2 de l'annexe-1.

II.3.1.2 Préparation et alignement des structures protéiques

L'ensemble des structures protéiques récupérées de la PDB est visualisé en 3D en utilisant les programmes Accelrys (*Discovery Studio Visualizer*) et UCSF Chimera. Le traitement de ces structures consiste à séparer les protéines en chaînes individuelles, à repérer les molécules d'eau qui sont dans le site de liaison et à aligner les chaînes dans le même espace de coordonnées. Ceci constitue une étape de préparation des structures protéiques pour l'étude de la cartographie du site de liaison.

L'unité fonctionnelle (incluant le site de liaison) des REs est un monomère peptidique, mais les modes de cristallisation font que plusieurs chaînes polypeptidiques (nommées par différentes lettres) peuvent apparaître dans l'unité asymétrique. A titre d'exemple les structures 1QKN⁸ (Pike ACW *et al.*, 1999) et 2Q70⁹ (Richardson TI *et al.*, 2007) sont deux REβ. La protéine 1QKN correspond à une structure monomérique, elle sera représentée sous la forme de 1QKN_ alors que la protéine 2Q70 est dimérique, chaque sous-unité peptidique sera représentée par 2Q70a et 2Q70b. On génère de cette manière, une liste de chaînes polypeptidiques simples dérivée de chaque structure protéique.

L'enjeu est donc de choisir parmi ces dérivées, pas une structure protéique (2Q70), mais une chaîne type (A, B, ...) représentante de chaque protéine. Il est également important de disposer d'une chaîne protéique la plus complète possible, ce qui n'est pas toujours évident à trouver. En effet, des parties de la protéine (chaînes latérales de résidus, atomes, portions de la protéine) peuvent être absentes dans la structure cristallographique. Il faut donc vérifier la présence de l'ensemble des éléments structuraux, au moins au niveau du site de liaison. S'il manque des atomes, certains programmes ne pourront pas calculer et d'autres introduiront des biais dans le calcul.

Une fois ce travail réalisé, une banque de données simplifiée, constituée de chaînes protéiques représentantes des protéines correspondantes sera prête à utiliser. Une étape d'alignement structural (avec le module MatchMaker de Chimera) est primordiale pour la comparaison des invariants structuraux, en particulier au voisinage du site de liaison. Une résultante de cet alignement est le fait que les structures sont alignées dans le même espace de coordonnées (Figure 25).

⁸ **1QKN**- <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1QKN> - Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (*Homo sapiens*) et d'une résolution de 2,25 Å, la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique.

⁹ **2Q70**- <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2Q70> - Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (*Homo sapiens*), la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique.



Figure 25 : Alignement structural de différentes¹⁰ chaînes peptidiques du RE α .

Si les structures sont très similaires (ce qui est le cas de cette famille de récepteurs), les sites de liaisons apparaîtront alignés et alors les ligands le seront aussi, ce qui permettra de procéder aux différentes comparaisons structurales, au niveau du site de liaison (conformation, résidus, molécules d'eau, ...) et au niveau des ligands (interactions, pharmacophores, ...) co-cristallisés

II.3.1.3 Eléments d'analyse structurale des protéines RE α et RE β

L'alignement des structures dans le même espace de coordonnées permet de repérer les motifs variables entre les chaînes protéiques. Pour faciliter l'analyse structurale, la recherche des éléments qui reflètent la dynamique structurale de l'ensemble du complexe protéine-ligand est nécessaire. Parmi ces éléments, on cite notamment :

- la cartographie du site actif ainsi que les résidus impliqués dans le phénomène de la liaison moléculaire ;
- la recherche d'éléments de flexibilité et de dynamique structurale au voisinage du site de liaison au ligand (boucles, hélices, canaux, chaînes latérales) ;
- la recherche d'éléments de variabilité entre sous-unités dans les structures par méthodes de visualisation et d'alignement structural ;
- la recherche des molécules d'eau et des cofacteurs (NADH, CoA, ...) qui peuvent agir au niveau d'interaction du ligand avec son récepteur ;
- la recherche des invariants structuraux au niveau des ligands.

¹⁰ Chaînes polypeptidiques : 1XPC_, 1A52a, 1ERRa, 1GWQa, 1L2Ia, 1R5Ka, 1SJO_, 1UOM_, 1X7R_, 1XP1_, 1XP6_, 1XP9_, 1XQCa, 1YIM_, 1YIN_, 1ZKYa, 2AYR_, 2B1Va, 2BJ4a, 2IOG_, 2IOKa, 2JF9a, 2JFAa, 2OUZ_, 2P15a, 2POGa, 2Q70a, 2R6Wa, 2R6Ya, 3DT3a, 3ERDa, 3ERT_.

Ainsi, en ce qui concerne la cartographie du site actif, nous avons repéré un site unique de liaison large et flexible pouvant intégrer une grande variété de ligands de tailles différentes. Ce site actif adopte probablement une configuration induite suite à sa liaison aux ligands (Brzozowski AM *et al.*, 1997).

Généralement, le site est constitué d'une partie dans le plan horizontal faisant appel à un canal à son extrémité et une autre partie dans le plan vertical. La Figure 26 représente un exemple de conformation adoptée par le site actif de la protéine 3ERT¹¹ (Shiau AK *et al.*, 1998) suite à sa liaison au 4-hydroxytamoxifène (OHT), ligand de grande taille.

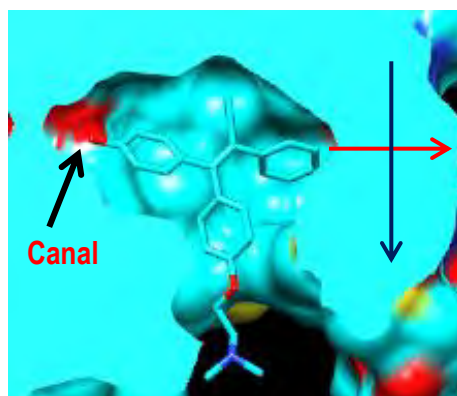


Figure 26 : Surface du site actif de la protéine 3ERT_ renfermant un ligand de grande taille.

Ensuite, les résidus d'acides aminés qui interagissent directement avec le ligand ont été définis parmi lesquels, la phénylalanine (Phe) 404 qui entre en interaction avec la partie phényle des ligands (Figure 27, C) (Brzozowski AM *et al.*, 1997). Cette partie qui est toujours présente au niveau des ligands, constitue l'invariant structural des ligands des REs et servira de point de sélection dans les calculs ultérieurs. En outre, la nature des interactions prédominantes dans le site de liaison a été déterminée. Ces interactions sont majoritairement de type hydrophobe sauf dans le canal où une molécule d'eau est co-cristallisée dans la plupart des structures dévoilant ainsi la partie hydrophile du site.

¹¹ **3ERT**- <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3ERT> - Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (*Homo sapiens*) et d'une résolution de 1,90 Å, la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique.

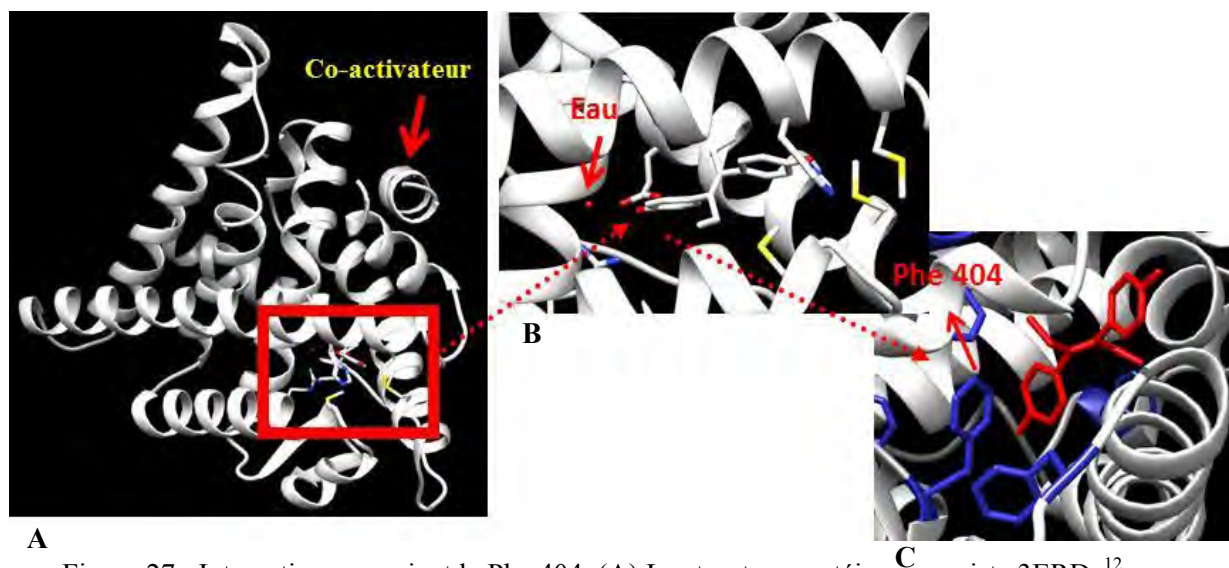


Figure 27 : Interactions associant la Phe 404. (A) La structure protéique agoniste 3ERDa¹² co-cristallisée avec son ligand, (B) le ligand pointe par sa partie phényle vers la molécule d'eau, (C) l'interaction entre la Phe 404 et la partie benzène du ligand (Shiau AK *et al.*, 1998).

La fonction hydroxyle du cycle phényle qui pointe vers le canal, assure une liaison hydrogène entre le ligand et la molécule d'eau favorisant toujours l'orientation des ligands dans la même position dans le site (Figure 27, B). Au niveau de ce canal, les résidus d'acides aminés Glu 353 et Arg 394 interagissent avec les ligands par l'intermédiaire des liaisons hydrogènes (partie hydrophile du site) (Figure 28). Ces deux résidus sont toujours présents à l'entrée du canal (des deux côtés) quelle que soit la structure protéique.

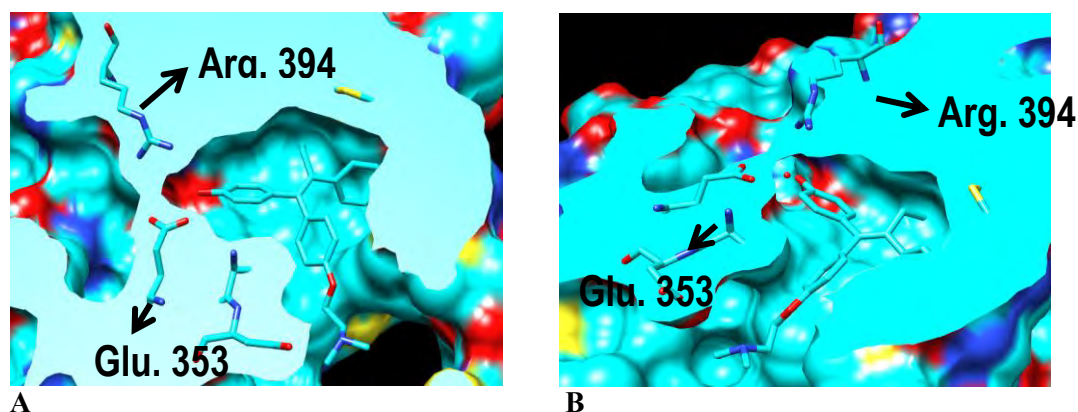


Figure 28 : Structure 3ERT₋ : détail des acides aminés à l'entrée du canal. (A) Vue en face du canal, (B) Vue du côté droit du canal.

Deux exemples d'interaction des acides aminés avec les ligands figurent dans les figures suivantes (Figure 29). La Figure 29 A correspond à l'interaction d'un agoniste

¹² 3ERD- <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3ERD> - Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (Homo sapiens) et d'une résolution de 2,03 Å, la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique.

(œstradiol, EST) dans son site de 1G50a et la Figure 29 **B** constitue l'exemple d'un antagoniste (OHT) dans son site de 3ERT_.

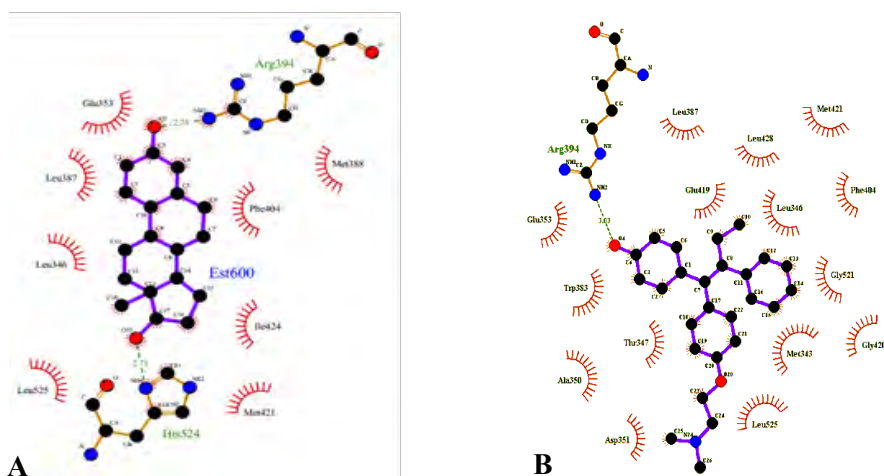


Figure 29 : Exemple de réseaux d'interactions moléculaires. (A) Un agoniste (EST) dans son site, (B) un antagoniste (OHT) dans son site. Les liaisons hydrogènes sont représentées en vert et les zones d'interactions (autres types d'interactions) avec les résidus sont représentées en rouge. Diagramme 2D obtenu avec LigPlot.

Une très forte conservation du «backbone» des protéines est constatée (Figure 30). En ce qui concerne la variabilité entre les chaînes protéiques, des modifications structurales au niveau de la boucle 4 ont été repérés. Ces dernières facilitant le mouvement de l'hélice H12 entraînant ainsi le changement topologique du site de liaison.

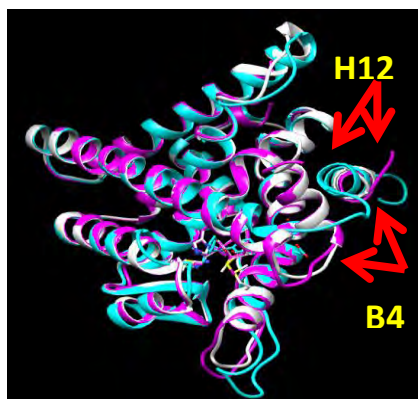


Figure 30 : Alignement des structures 3ERDa, 3ERDb (position agoniste de l'hélice, rose et blanc) et de la structure 3ERT_ (position antagoniste de l'hélice, bleu).

Le changement de position de cette hélice fait partie du phénomène d'adaptation induite des récepteurs aux ligands (Brzozowski AM *et al.*, 1997).

Ces différents éléments structuraux serviront de repères et aideront *i)* à paramétrer les calculs pour qu'ils soient reproduits à partir des ligands de référence (étalons) et *ii)* à interpréter les résultats de calculs obtenus à partir de ligands conçus *de novo*.

A ce stade, les protéines sont prêtes alors pour une étape de tri structural en vue de sélectionner les structures typiques de chaque récepteur.

II.3.1.4 Regroupement des structures protéiques

Chaque type de récepteur est représenté par un grand nombre de chaînes protéiques (47 pour le RE α et 33 pour le RE β). Mais dans la mesure où certaines chaînes de la collection sont superposables entre elles, il n'est pas nécessaire de procéder à l'arrimage moléculaire sur toutes les structures. Dans ce cas, il faut réaliser un tri en regroupant les structures identiques. Un autre avantage de cette méthode, est de distinguer les conformations qui correspondent à un certain type de ligand. En effet, il arrive que selon le site de liaison ou par des phénomènes structuraux à l'adaptation induite au ligand, un type structural (une conformation particulière de la protéine) soit corrélable à un type de structure chimique, donc de composé. Il s'agit d'une conformation importante dans un processus de conception, qu'il faut systématiquement chercher à obtenir quand il existe suffisamment de structures ligandées. Un troisième avantage de cette méthode est que parfois en classifiant les conformations de la protéine (par regroupement), on obtient des conformations sur la dynamique structurale du site, donc de reconstituer les événements (ouverture, fermeture) au moyen de conformations dites canoniques (par exemple : état ouvert, intermédiaire, fermé) qui «balisent» l'évolution dans la séquence temporelle et dans l'espace du système.

La classification en sous-classes de n structures protéiques est envisagée selon deux critères principaux, l'un concerne l'homologie de structure entre les ligands et l'autre repose sur la topologie de l'hélice H12.

L'hélice H12 peut adopter trois configurations différentes suite à sa fixation aux ligands. Ces conformations structurales donnent une idée plus réaliste du phénomène de liaison moléculaire et pourront expliquer la différence de réponses biologiques attendue de chaque ligand :

- la protéine en présence d'un agoniste (exemple : 1GWRa¹³, Warnmark A *et al.*, 2002) où l'hélice H12 est en position fermée,
- la protéine en présence d'un antagoniste (exemple : 3ERT_) où l'hélice H12 est en position ouverte,

¹³ **1GWR**- <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1GWR> - Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (*Homo sapiens*) et d'une résolution de 2,40 Å, la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique.

- la protéine en présence d'un ligand intermédiaire (exemple : 1R5Kc¹⁴, Wu YL *et al.*, 2005) où l'hélice H12 est en position semi-ouverte.

Le comportement de l'hélice H12 varie en fonction du type et de la taille du ligand. En effet, la fixation d'un ligand de type agoniste, molécule de taille relativement petite et plane, entraîne le repliement de l'hélice sur le ligand facilitant sa liaison avec les cofacteurs (activation de la fonction AF-2 du récepteur), déclenchant ainsi la transcription des gènes de la prolifération cellulaire.

Alors qu'en présence d'un ligand de type antagoniste, l'hélice H12 est repoussée au dessus du site vu la grande taille du ligand (Heldring N *et al.*, 2007). La transcription sera bloquée à ce niveau parce que la position de l'hélice empêche sa liaison aux cofacteurs de transcription. Un cas intermédiaire est observé, c'est celui de 1R5Kc, où l'hélice H12 est en position semi-ouverte. Ce cas paraît intéressant à étudier, la fonction du ligand correspondant est ignoré.

La Figure 31 correspond à un exemple d'alignement structural des trois chaînes protéiques issues des structures agonistes (1GWRa, vert), antagonistes (3ERT_, blanc) et intermédiaires (1R5Kc, rose) où la différence majeure est observée au niveau de la structuration de l'hélice H12.

¹⁴ 1R5K- <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1R5K> - Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (*Homo sapiens*) et d'une résolution de 2,70 Å, la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique.

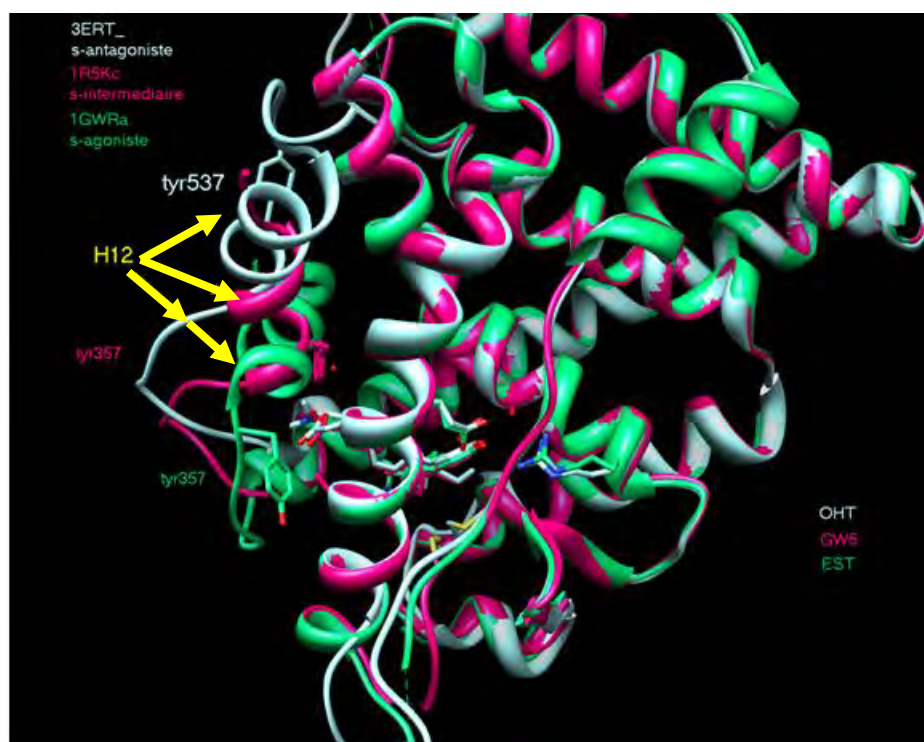


Figure 31 : Alignement des trois structures protéiques : agoniste (1GWRa ; EST, vert), antagoniste (3ERT_ ; OHT, blanc) et une structure intermédiaire (1R5Kc ; GW5, rose).

La variabilité des structures des ligands est analysée en comparaison avec la surface du site de liaisons qu'ils occupent. A ce point, la sélection des structures typiques a été affinée à l'aide du classement des ligands selon leur taille et leur fonction (exemple : *i*) œstradiol modifié, molécule de taille identique à l'œstradiol mais avec différents substituants ; *ii*) molécule en H, composé de grande taille, de forme identique à la lettre alphabétique «H»). Ce classement permet une meilleure représentation de l'ensemble des 47 structures du RE α d'une part et des 33 structures du RE β d'autre part en comparaison avec une étude récente de Park *et al.* où leur classification est basée seulement sur les conformations actives/inactives des REs (Park SJ *et al.*, 2010). En effet, tous les ligands possèdent au moins un cycle benzène, voire un cycle phényle pour la plupart. Ils se superposent alors au niveau de leur partie phényle mais avec des différences de taille, planéité et de substitution (Figure 32).

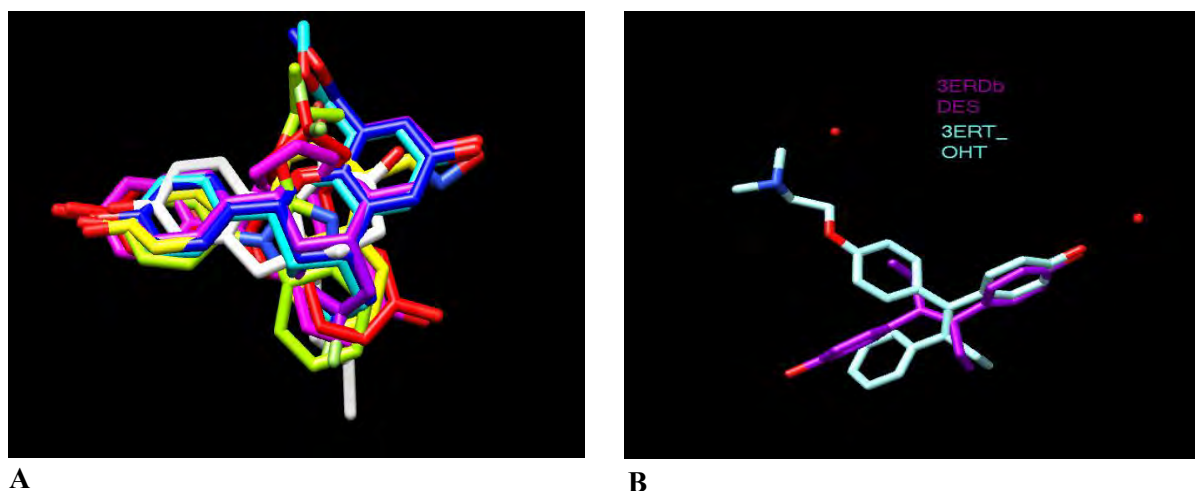


Figure 32 : Aligment des ligands résultant de l'aligment des protéines. (A) aligment de la totalité des ligands, (B) deux exemples de ligands, l'un agoniste (DES) et l'autre antagoniste (OHT).

En ordonnant l'ensemble des différences structurales, au niveau des protéines et au niveau des ligands, des sous-classes regroupant des sites et des composés structuralement similaires ou ayant des points communs seront générées. Ainsi, le RE α ayant 47 structures dans la PDB est représenté par six formes canoniques alors que le RE β représenté par les 33 structures est classé en cinq formes typiques.

II.3.1.5 Classification des RE α

Les 47 structures protéiques du RE α sont classifiées en sous-classes ayant des critères communs. La surface du site étant variable, la classification se fait suivant la forme du ligand et la position de l'hélice H12.

Les observations structurales montrent que lorsque l'hélice H12 est en position fermée (cas agoniste), les ligands sont de petite taille. Cet événement est divisé en deux familles différentes :

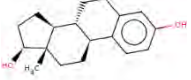
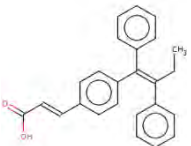
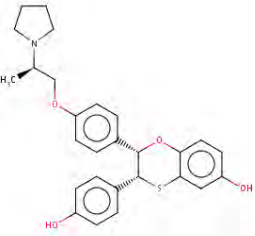
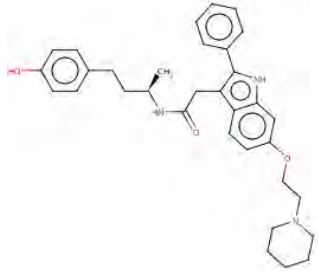
- les ligands œstradiol ou œstradiol « like »,
- les ligands œstradiol modifié, où le site présente quelques variations de surface par rapport à la famille des ligands œstradiol.

D'autre part, lorsque l'hélice H12 est en position ouverte (cas antagoniste), les ligands sont de grande taille. Ils sont divisés alors en 3 familles différentes :

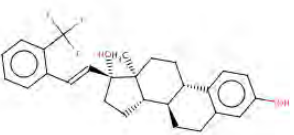
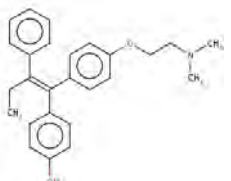
- les dérivés du raloxifène en forme de « T »,
- les molécules en « H » (nouvellement définies) type antagonistes avec un petit T,
- les dérivés du tamoxifène en forme de « T ».

Par ce classement, six familles canoniques représentantes de la totalité des 47 ligands du RE α ont été générées et sont résumées dans le Tableau 14. Il est à noter que chacune de ces familles regroupe un nombre n défini de structures protéiques. La colonne RE α indique la structure canonique représentative de la classe, la colonne NE indique le nombre de structures par classe, la colonne ligand indique le composé chimique cocrystallisé dans la structure canonique et la colonne HC (*Hetero Compound*) indique le nom de ce composé tel qu'il apparaît dans les structures PDB.

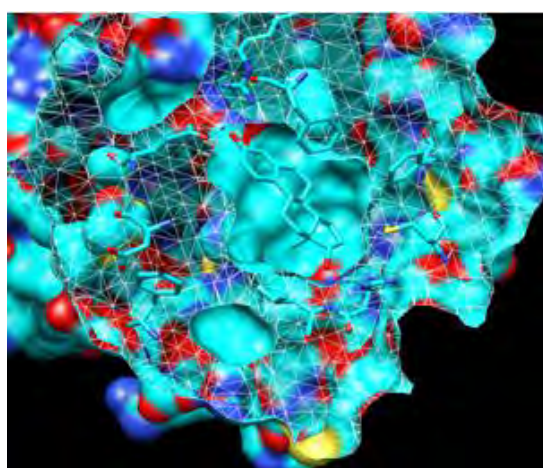
Tableau 14 : Les familles et structures canoniques du RE α .

RE α	Structures	NE	Ligand	HC	Famille	Classe
1G50a	1A52, 1ERE, 1G50, 1GWR, 1PCG, 1QKT, 1QKU, 2OCF, 1ZKY, 2B1V, 2FAI	11		EST	Œstradiol ou œstradiol « like »	agoniste
1R5KaR	1R5K	1		GW5	Structures intermédiaires	antagoniste
1XPC_	1XPC, 1ERR, 1SJO, 1UOM, 1XP1, 1XP6, 1XP9, 1XQC, 1YIM, 1YIN, 2AYR, 2JFA, 2OUZ, 2R6W, 2R6Y, 3DT3, 2POG, 2Q70	18		AIT	Dérivés du raloxifène en forme de « T »	antagoniste
2IOG_¹⁵	2IOG, 2IOK	2		IOG	Molécules en « H » (nouvellement définies) type antagonistes avec un petit « T »	agoniste / antagoniste

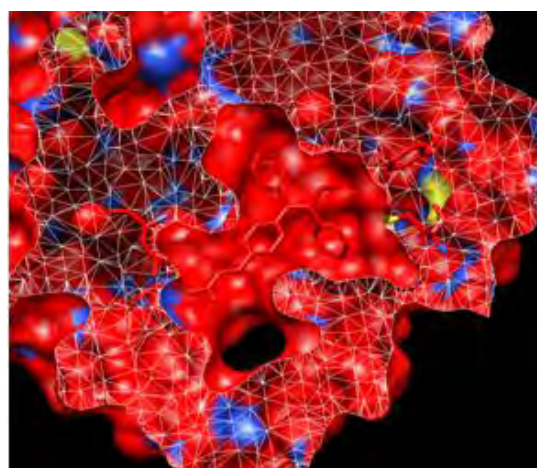
¹⁵ **2IOG**- <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2IOG> - Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (*Homo sapiens*) et d'une résolution de 1,60 Å, la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique (Dykstra KD *et al.*, 2007).

2P15bR¹⁶	2P15, 3ERD, 1GWQ, 1X7E, 1X7R	5		EZT	Œstradiol modifié	agoniste
3ERT₋	2BJ4, 2JF9, 3ERT	3		OHT	Dérivés du tamoxifène en forme de « T »	antagoniste

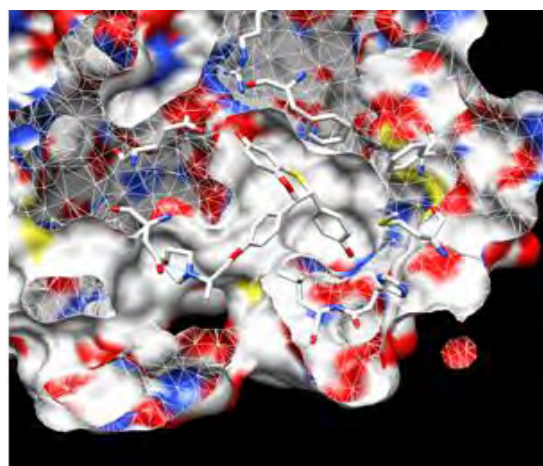
Le site actif des familles ci-dessus est variable, il dépend surtout de la taille de son ligand. La surface des sites actifs de ces familles est représentée dans la Figure 33.



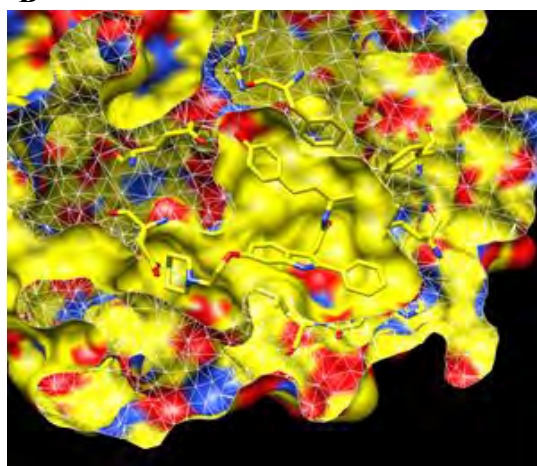
A



B



C



D

¹⁶ **2P15**- <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2P15> - Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (*Homo sapiens*) et d'une résolution de 1,94 Å, la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique (Nettles KW *et al.*, 2007).

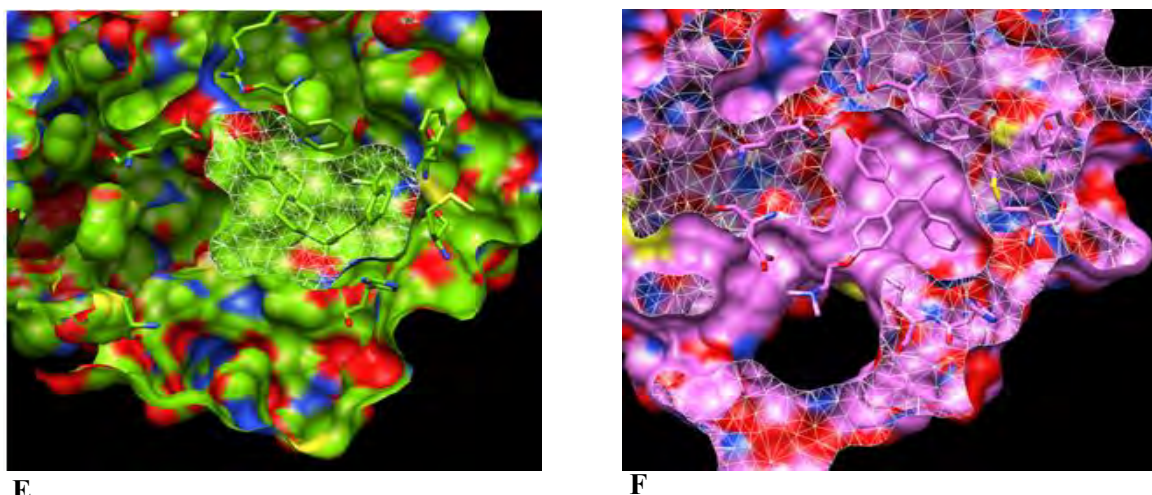


Figure 33 : Vue du site de liaison des 6 structures canoniques du RE α (incluant les ligands correspondants). (A) 1G50a, (B) 1R5KaR, (C) 1XPC, (D) 2IOG_, (E) 2P15bR, (F) 3ERT_.

II.3.1.6 Classification des RE β

Les structures protéiques du RE β présentent une grande homologie de structure avec celles du RE α sauf au niveau du site de liaison où quelques variations sont visibles. En effet, la taille du site de liaison du RE β est plus petite que celle du RE α et par conséquent, la taille de ses ligands est plus réduite.

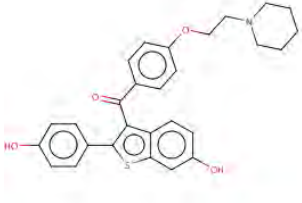
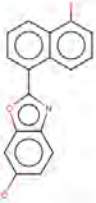
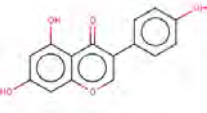
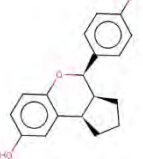
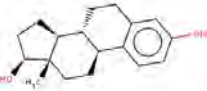
Le cas des ligands antagonistes est représenté par une seule famille, ce sont les ligands avec une structure en T. Alors que le cas des ligands agonistes est divisé en 4 familles :

- l'œstradiol,
- les Ligands avec des structures EST «like», où ils présentent 4 cycles dans le plan,
- les Ligands avec des structures EST «like», où ils présentent 3 cycles dans le plan,
- les Ligands avec des structures EST «like», où ils présentent 3 cycles dans le plan substitués.

Cinq familles canoniques représentantes de la totalité des 33 ligands pour le RE β ont été générées. L'ensemble de ces familles est illustré dans le

Tableau 15, la surface du site de ces familles types du RE β , étant plus petite que le RE α , est représentée dans la Figure 34.

Tableau 15 : Familles et structures canoniques du RE β (mêmes conventions que dans le cas des RE α).

RE β	Structures	NE	Ligand	HC	Famille	Classe
1QKN ₋	1NDE, 1QKN, 2FSZ	3		RAL	structures en « T »	antagoniste
1U3Sa ¹⁷	1L2J, 1U3R, 1U3S	3		797	Structures EST « like » (a. 4 cycles dans le plan)	agoniste
1X7R ₋ ¹⁸	1QKM, 1U3Q, 1U9E, 1X76, 1X78, 1X7B, 1X7J, 1X7R, 1YY4, 1YYE, 1ZAF	11		GEN	Structures EST « like » (b. 3 cycles dans le plan)	agoniste / antagoniste
2IOJc ¹⁹	2GIU, 2IOJ, 2JJ3, 2NV7, 2Q70, 2QTU, 2YJD, 2Z4B	8		IOG	Structures EST « like » (c. 3 cycles dans le plan substitués)	agoniste
2YJA ₋ ²⁰	2J7Y, 2YJA, 3OLL, 3OLS, 2J7X 3OMO, 3OMP, 3OMQ	8		EST	Œstradiol	agoniste

¹⁷ **1U3S**- <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1U3S> - Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (*Homo sapiens*) et d'une résolution de 2,50 Å, la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique (Malamas MS *et al.*, 2004).

¹⁸ **1X7R**- <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1X7R> - Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (*Homo sapiens*) et d'une résolution de 2,00 Å, la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique (Manas ES *et al.*, 2004).

¹⁹ **2IOJ**- <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2IOJ> - Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (*Homo sapiens*) et d'une résolution de 2,15 Å, la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique.

²⁰ **2YJA**- <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2YJA> - Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (*Homo sapiens*) et d'une résolution de 2,82 Å, la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique (Philips C *et al.*, 2011).

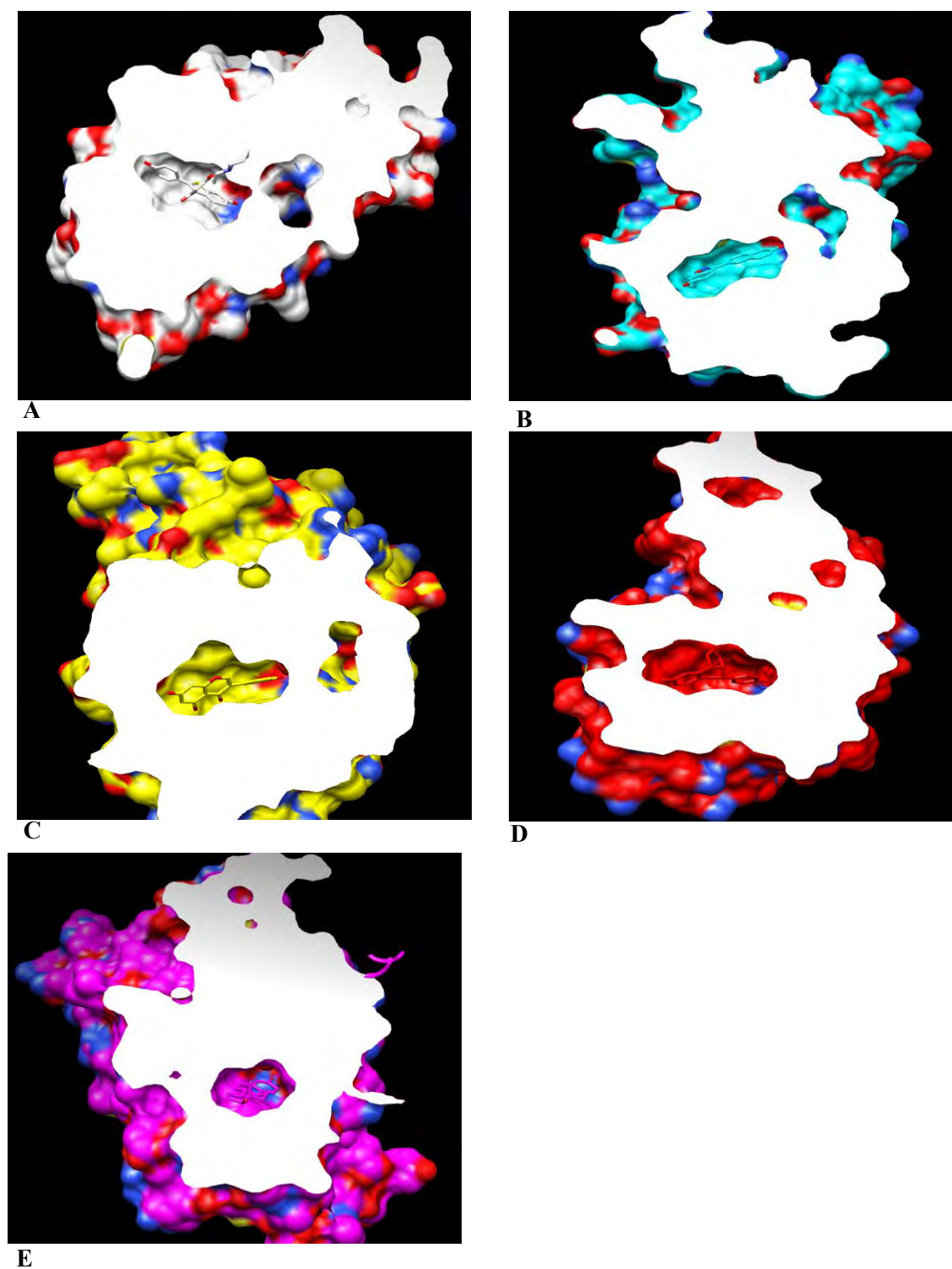


Figure 34 : Vue du site de liaison des 5 structures canoniques du RE β (incluant les ligands correspondants). (A) 1QKN_, (B) 1U3Sa, (C) 1X7R_, (D) 2I0Jc, (E) 2YJA_.

II.3.2 Interprétations générales du système

Quelques conclusions peuvent être tirées de l'analyse structurale du système récepteur-ligand. L'interprétation de ces résultats se fait à deux niveaux : site de liaison et ligand.

II.3.2.1 Analyse du site de liaison

Les récepteurs aux œstrogènes sont des protéines avec des sites de liaison flexibles pouvant intégrer une variété de composés stéroïdiens et/ou non stéroïdiens. En conséquence, le site actif n'a pas une topologie invariante mais elle sera corrélée à la taille et à la fonction du ligand (agoniste ou antagoniste). Dans le but de comprendre la dynamique de ce site, la surface des REs a été découpée transversalement et le site est divisé en quatre régions principales (Figure 35) :

- Une cavité (poche) essentielle (A) où l'œstradiol se loge dans le plan horizontal.
- Un canal où une molécule d'eau est quasiment présente et co-cristallisée avec le complexe. Ce canal est souvent ouvert lorsque le ligand est plus grand que l'EST.
- une deuxième poche à la sortie du canal qui est plus petite que la poche A dans le cas du RE α mais généralement plus grande dans le cas du RE β , c'est la cavité B.
- Dans certains cas, la poche A possède des extensions vers le plan vertical surtout lorsque le ligand est un antagoniste de grande taille. Cette extension est attribuée à une troisième poche, la cavité C.

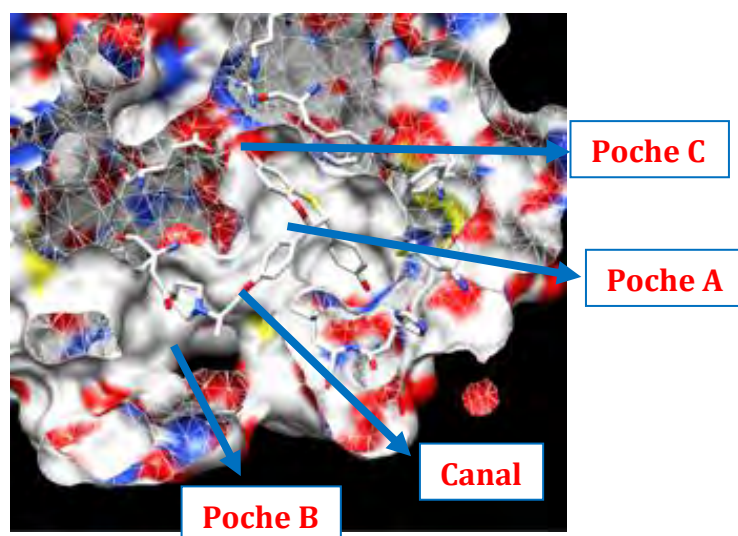


Figure 35 : Organisation du site de liaison des REs.

Ces régions seront discutées plus tard lors de la réalisation d'expériences d'arrimage moléculaire. Les récepteurs aux œstrogènes présentent un site de liaison assez vaste et flexible, pouvant acquérir des conformations variables, ce qui explique le choix de se limiter à des conformations canoniques pour envisager les calculs du docking. La classification des chaînes protéiques et des ligands a permis alors d'accéder à une représentation globale de toutes les

conformations possibles, présentes dans la cristallographie, adoptées par les récepteurs lors de la fixation du ligand.

L'hypothèse émise, est que cette classification sépare les sites à tendance agonistes de ceux à tendance antagonistes ; ce qui fait que les ligands agonistes préfèrent se loger dans des conformations agonistes tandis que les ligands antagonistes préfèrent des conformations antagonistes. En conclusion, le docking pourrait reproduire les données expérimentales, au moins en termes de caractère agoniste et antagoniste des ligands.

Pour les calculs de l'arrimage moléculaire, chaque ligand sera donc arrimé dans les six structures du RE α et dans les cinq structures du RE β .

II.3.2.2 Analyse des ligands dans leur site

Il est bien connu dans la littérature que la fixation des ligands aux récepteurs d'œstrogènes se fait par l'intermédiaire d'un cycle phényle (Appendino G *et al.*, 2002 ; Nazrullaev SS *et al.*, 2008). Dans notre cas, la majorité des ligands possèdent dans leur structure le pharmacophore phényle (ou au moins un cycle benzène) indispensable au procédé de la fixation moléculaire.

L'analyse de la fixation des ligands dans leur site montre que la partie phényle s'oriente toujours vers le canal à travers la fonction hydroxyle qui assure l'interaction avec la molécule d'eau co-cristallisée avec le complexe. Quelque soit le type du ligand analysé (agoniste ou antagoniste), la position du cycle phényle se reproduit, ce qui donne à ce pharmacophore une grande importance surtout lors de l'interprétation des résultats du docking. En effet, l'agencement structural de cette partie phényle servira de critère de sélection de poses lors des calculs d'arrimage moléculaire. Des poses conformes seront alors sélectionnées. Une pose réfère à une conformation obtenue après le calcul d'arrimage moléculaire (voir partie suivante, arrimage moléculaire).

Les figures suivantes montrent le positionnement de quelques ligands dans leurs sites de liaison (Figure 36). En effet, l'œstradiol occupe le plan horizontal du site (poche A, Figure 36 **A**). Lorsque la taille des ligands augmente (de A à B puis C), la surface du site augmente parallèlement faisant accès à deux, puis à trois cavités supplémentaires dans le cas des composés antagonistes de grande taille (Figure 36 **B** et **C**).

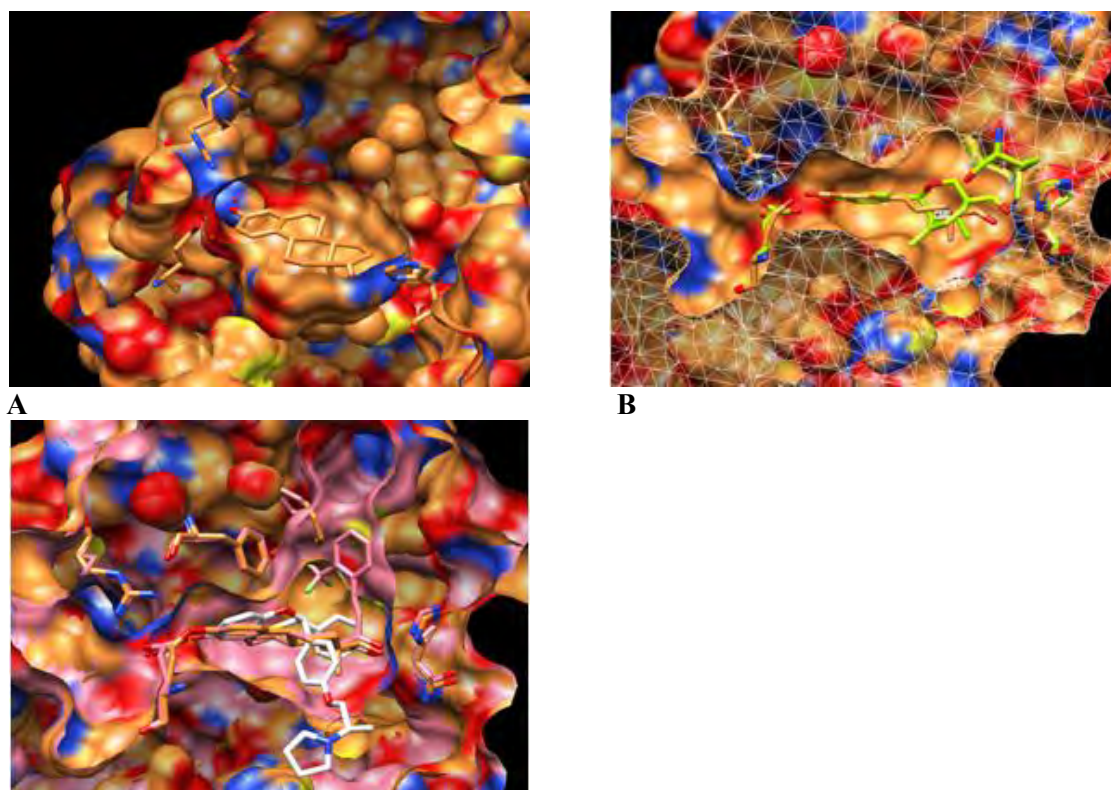


Figure 36 : Ligands dans le site de liaison. (A) Vue de la surface du site de l'œstradiol (protéine 1G50) (il occupe le plan horizontal de la poche A en ayant sa partie phényle orientée vers le canal où se trouve la molécule d'eau), (B) La surface du site d'un ligand à structure compacte (459 dans la protéine 2FAI²¹) (Hiseh RH *et al.*, 2006), plus petite que celle de l'œstradiol, (C) Le site de deux molécules, EZT dans la protéine 2P15 (Nettles KW *et al.*, 2007) et AIT dans la protéine 1XPC (Blizzard TA *et al.*, 2005) qui ont des structures plus grandes que l'œstradiol (le site est plus grand).

D'une manière générale, l'étude structurale recouvre des questions relevant d'une part de la cartographie du site de liaison et d'autre part de l'interaction entre les ligands et leurs récepteurs (étude du complexe « récepteur-ligand »).

A partir des données de cette étude, une plateforme de travail a été établie, elle est constituée de protéines (six structures pour le RE α et cinq pour le RE β) et de ligands dont la conformation dans le site de liaison est connue et typique de la structure canonique. Ces structures seront prêtes pour les calculs d'arrimage moléculaire, ce qui permettra de voir comment ces conformations canoniques vont répondre vis-à-vis de l'ensemble des ligands trouvés dans les structures PDB des RE α/β . En d'autres termes, si un ligand qui a une activité antagoniste va s'arrimer préférentiellement dans une structure antagoniste et, réciproquement

²¹ 2FAI - <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2FAI> - Il s'agit d'une structure obtenue par cristallographie de rayons X, correspondant à un récepteur humain (*Homo sapiens*) et d'une résolution de 2,10 Å, la protéine est complexée (ligandée) avec un composé organique.

pour les ligands agonistes. En retour, la méthode d'arrimage devra être paramétrée pour produire ce type de résultats. Si c'est le cas, des ligands non cristallographiés (tel la férutinine) pourront être testés *in silico* en utilisant le même protocole.

II.4 Introduction à l'arrimage moléculaire (docking)

L'enjeu des travaux effectués au cours de cette thèse est la conception *in silico* de molécules, analogues de la férutinine, potentiellement intéressantes dans le processus d'inhibition des récepteurs aux œstrogènes. La faculté de cette protéine à surveiller les phénomènes de prolifération et de différenciation tissulaires rend son inhibition cruciale dans les traitements des cancers hormono-dépendants. Dans ce but, la stratégie adaptée, implique l'utilisation de calculs d'arrimage moléculaire après l'étape d'analyse structurale et la classification des protéines. Le but était de comprendre le double effet biologique qu'exerce la férutinine (agoniste du RE α et agoniste/antagoniste du RE β) sur la prolifération des lignées cellulaires hormono-dépendantes et d'orienter ensuite les synthèses chimiques d'analogues sur la base des résultats théoriques du système.

II.4.1 Le processus d'arrimage

L'étude du site de liaison des différents ligands des récepteurs aux œstrogènes a identifié les résidus protéiques impliqués dans le phénomène de reconnaissance moléculaire ainsi que les pharmacophores du ligand essentiels à ce processus. Ces informations ont été converties en contraintes pour le calcul et en éléments d'analyse. A partir de ces connaissances, les composés (analogues de la férutinine) seront arrimés sur un récepteur RE α ou β . L'analyse des résultats d'arrimage moléculaire aboutira alors à la sélection d'une ou de plusieurs molécule(s) intéressante(s) possédant théoriquement une bonne affinité vis-à-vis des récepteurs en position antagoniste.

Généralement, les techniques d'arrimage moléculaire permettent de prédire, par des méthodes de calcul, les structures de complexes ligand-protéine en partant d'un ensemble variable de conformations et d'orientations du ligand (flexible ou non flexible) et parfois du récepteur (chaînes latérales, des résidus et « backbone » flexible ou non).

Le processus global (Figure 37) se déroule en différentes étapes présentées ici comme consécutives, mais ce n'est pas toujours le cas (selon le logiciel utilisé) :

- la première étape consiste à paramétrer le site de liaison (choix des résidus impliqués, flexibilité des résidus, contraintes, ...)

- la deuxième étape dite d'arrimage moléculaire (appelée « docking ») permet de lancer tous les calculs de géométries possibles pour le complexe et de calculer les scores correspondants ;
- la troisième phase consiste à sélectionner/trier et regrouper (appelée « *clustering* ») les scores. Il s'agit de faire ressortir des conformations représentatives (que nous appelons poses). Cette étape peut être directement issue de la seconde ou être complétée par des calculs intermédiaires. Par exemple une minimisation du complexe ou un calcul de dynamique moléculaire
- la quatrième étape consiste en l'analyse des résultats. En fonction du nombre de poses par calculs (appelés « runs ») indépendants pour un ligand, elle implique souvent une inspection visuelle de chaque pose et des calculs de descripteurs, également des mesures d'écarts (RMSD²²) ou encore des analyses statistiques.

En général, le processus d'arrimage, au sens strict, concerne les étapes 2 et une partie de l'étape 3. Il existe près d'une centaine d'algorithmes de docking-scoring, certains originaux, d'autres (dits dégénérés) dérivant les uns des autres. Les détails sur le choix des algorithmes ne font pas partie de cette étude.

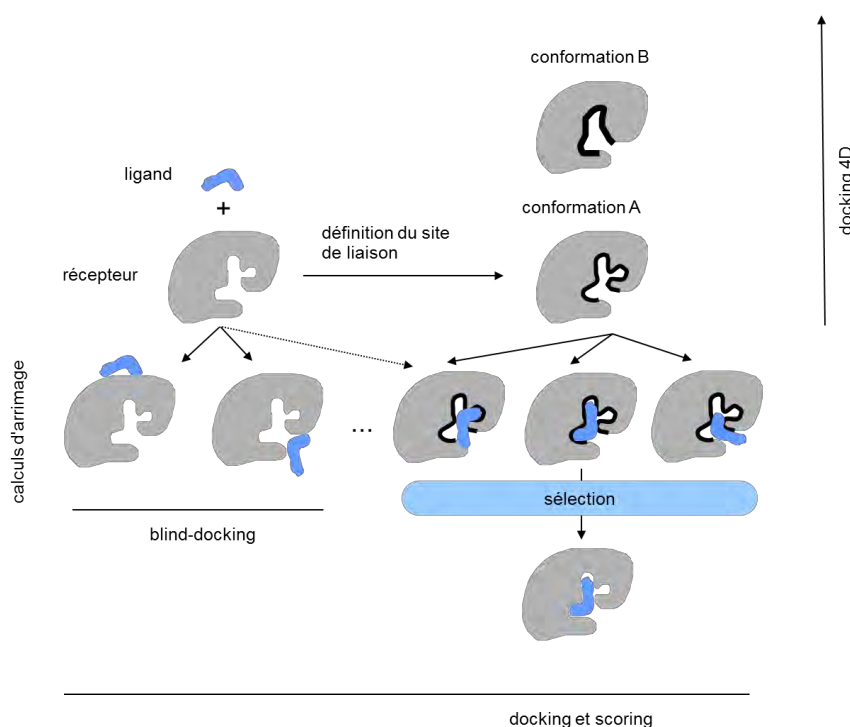


Figure 37 : Processus global d'arrimage (docking et scoring). Le cas de 1 ligand vis-à-vis de 1 ou n structures protéique est représenté (voir section Docking 4D).

²² Dans le cas précis, l'écart quadratique moyen (Root Mean Square Deviation) entre deux conformations de la même molécule, par exemple la conformation cristallographique du ligand et une pose de docking.

Le logiciel «*Molegro Virtual Docker*» (MVD) a été utilisé pour les calculs du docking-scoring. Le choix de ce logiciel est basé non seulement sur sa disponibilité dans le laboratoire, mais aussi sur sa capacité à gérer les molécules d'eau présentes dans le site et les cofacteurs qui co-existent avec le ligand dans quelques structures.

II.4.2 Scoring

Un score est, au sens large, une métrique qui doit rendre compte tenu de l'affinité d'un ligand pour sa contrepartie protéique et doit permettre de comparer des ligands différents. Le nombre de fonctions de score existant est élevé (de l'ordre d'une centaine) (Sousa SF *et al.*, 2013), ce qui veut dire qu'il y a toujours des arguments en faveur de l'une ou de l'autre. D'une manière générale, une fonction de score peut inclure des éléments liés au calcul de l'énergie du complexe protéine-ligand. Par exemple, des termes liés aux interactions hydrogènes, électrostatiques, Van der Waals, peuvent être injectés dans la fonction. Celle-ci peut également incorporer des termes liés à des connaissances ou à différents facteurs de pondération.

Les fonctions de scores sont testées sur des jeux de test («*training set*»), correspondant à des complexes protéines-ligands où la géométrie (conformations, structures PDB du complexe) et les affinités (K_d , ΔG) de liaison sont connues. Cela permet en retour de modifier la fonction pour qu'il y ait la meilleure corrélation entre affinités expérimentales et affinités calculées pour un jeu de test donné.

La fonction doit être paramétrée de manière à ce que les calculs reproduisent au mieux *i)* les géométries (RMSD minimum entre la conformation cristallographiée et la conformation calculée du ligand) et *ii)* le «*ranking*» (ordonnancement) des ligands (corrélation entre score et une grandeur expérimentale rendant compte de l'affinité du ligand pour la protéine). Ceci signifie que les ligands avec le meilleur score (en général la valeur la plus négative possible) correspondent aux ligands ayant la meilleure affinité vis-à-vis de la protéine, et que cette corrélation prédiction-expérience sera la plus linéaire possible. Une fonction de score est donc dépendante à la fois du «*training set*» et de sa définition intrinsèque.

Il faut cependant noter que la fonction de score n'est pas le seul élément critique d'un processus de docking-scoring. Il s'agit d'un processus d'optimisation, où l'algorithme (voir simplex, algorithme génétique, ...) utilisé pour minimiser la fonction de score sera plus ou moins efficace face à un problème donné, même s'il arrive à convergence (et non arrêt après un nombre fixé de pas de calcul). La manière dont l'outil d'arrimage sélectionne la

conformation/pose de meilleur score est également importante. En effet selon l'algorithme de clustering utilisé, la répartition entre les poses significatives après un calcul, peut être différente. D'autres paramètres s'ajouteront également lors des calculs sous contraintes (par exemple, l'utilisation de pharmacophores ou la flexibilité des chaînes latérales des résidus du site actif).

Compte tenu de ces incertitudes, il est nécessaire de disposer d'un outil d'arrimage qui accède à un paramétrage des différents composants (docking, scoring, clustering). Le logiciel MVD utilisé correspond à cette définition, avec au moins une trentaine de paramètres ajustables, permettant ainsi d'élaborer des procédures d'arrimage très spécifiques en fonction de chaque système étudié.

II.4.3 Sélection des poses (efficacité-conformité)

En ce qui concerne les scores, nous avons utilisé deux fonctions, intégrées à MVD : Moldock et Rerank. Ce type d'approche croisée est nécessaire car le but est de mettre au point un filtre pour le criblage des molécules potentiellement antagonistes des REs. En général, plusieurs fonctions de score ont été utilisées afin de privilégier les poses "fortes" correspondantes à la fois aux meilleures valeurs de plusieurs fonctions de scores. Il s'agit d'un critère lié à l'efficacité, mais qu'il ne faut pas toujours considérer comme *une fin* en soi. Par exemple, une petite molécule (fragment), sous-structure d'un ligand connu, pourra se lier dans une zone du site, différente de celle qui correspondait au ligand co-cristallisé de référence. Les scores seront donc meilleurs, mais ce n'est pas pour autant que le résultat aura plus de sens. Pour cette raison, le critère d'efficacité devrait être doublé par un critère de conformité, issu des analyses structurales, qui nous permettra de prédire la zone d'interaction et de la conformation d'un groupement chimique du ligand. Une valeur de RMSD, n'est qu'un élément de conformité lorsque la molécule calculée est la même que la molécule de référence. Dans le cas où les structures de ces deux molécules divergent, des indicateurs basés sur des critères bio-structuraux seront de plus en plus utilisés. Dans ce dernier cas, la conformité sera d'autant mieux définie lorsque nous aurons des données structurales cohérentes.

Le travail consiste donc à analyser les résultats en fonction de ces deux critères efficacité et conformité, et d'en déduire des indicateurs globaux, comparables d'une protéine à l'autre. La limite de ce type de méthodes reste l'automatisation, sur une petite ligandothèque et le nombre limité de structures protéiques. Un travail manuel est possible, au-delà il faut concevoir et implémenter des outils informatiques, qui restent à développer.

Concernant les scores pour la sélection des poses "fortes", les scores MolDock et Rerank ont été utilisés dans ce travail. Les fonctions de scores PLANTS, GPU, ont également été calculées, mais le système de calcul n'a pas été paramétré d'une manière à obtenir des résultats nettement reproductibles à partir de ces scores.

L'important dans ce cas est qu'un protocole cohérent soit défini, puis appliqué de manière systématique et cohérente à l'ensemble des calculs, puisque plusieurs structures protéiques vont être traitées et d'une manière indépendante.

C'est la définition de ce protocole qui est difficile à réaliser car il faut à la fois *i)* tenir compte de toutes les connaissances et *ii)* ne pas orienter les résultats dans un sens ou un autre (sélection d'une classe de ligands). C'est pour ces raisons que souvent les analystes préfèrent travailler en «aveugle» sans connaître les résultats (par exemple : les affinités de liaisons, CI_{50} , % d'inhibition) issus des tests *in vitro*.

Nous avons procédé dans cette étude de manière systématique sur toutes les molécules de la ligandothèque focalisée et utilisée dans les calculs d'arrimage, les tests biologiques ayant été réalisés après l'étape d'arrimage.

II.4.4 Docking 4D

La Figure 37 regroupe plusieurs modes d'arrimage différenciés par la couche horizontale (haut-gauche) qui regroupe le ligand, son récepteur et son site de liaison. Le processus de «*blind-docking*» (bas-gauche) ou d'arrimage en aveugle, consiste à cribler les cavités ou les sites potentiels de la structure protéique. Le processus de sélection (bas-droite) une fois associé à la première couche, correspond au processus d'arrimage tel qu'elle a été décrite au début de ce chapitre. Il peut s'appliquer à une structure protéique, ou d'une manière simultanée (le même ligand) à plusieurs structures protéiques. Il s'agit d'un protocole désigné par différents termes tels que «*ensemble docking*» (un ensemble de structures protéiques) ou «*4D docking*» (le passage à n structures amène une dimension supplémentaire).

Dans le cas de cette étude, l'analyse structurale a défini 5 ou 6 conformations canoniques de protéines du site de liaison susceptibles d'être utilisées par un processus d'arrimage. Nous sommes donc dans une logique de docking 4D. Ces structures protéiques seront testées pour chaque ligand, faisant passer le problème de 1 structure à $n = 6$ (pour les RE α , $n = 5$ pour les RE β).

D'une manière générale, ce type d'approche est élaboré dans l'optique de prendre partiellement en compte la plasticité du récepteur. Pour plus de précision, les notions de

plasticité et de flexibilité sont prises en considérations. Dans le premier cas, il s'agit de mouvements d'une certaine amplitude, au niveau du squelette de la protéine. Par exemple, une boucle qui se replie ou une hélice qui change de place. Le terme de flexibilité est limité aux résidus (ligand ou chaînes latérales des acides aminés du site de liaison). Les deux notions : plasticité-flexibilité, sont également reliées. En effet, lorsqu'un mouvement conformationnel se produit, il sera accompagné de mouvements des chaînes latérales des résidus qui se repositionnent. En revanche, les méthodes de calculs pour approcher ces deux notions sont assez différentes. Pour simuler la flexibilité pendant le processus d'arrimage, il existe des outils qui permettent un docking flexible, à la fois, au niveau du ligand et des résidus du site actif. Par contre, la plasticité est généralement prise en compte par d'autres méthodologies, essentiellement : dynamique moléculaire et mode normaux de vibration des protéines. Cependant, ces techniques posent autant de problèmes dans la simulation qu'elles peuvent amener de solutions. En particulier *i)* il faudra partir d'une conformation donnée (pas forcément représentative dans le cas d'une adaptation induite au ligand) puis *ii)* il faudra prendre en compte les molécules d'eau (ce qui augmente la complexité du système et les temps de calcul) et enfin *iii)* il faudra choisir des conformations représentatives dans la masse de données produites pour les injecter dans un processus d'arrimage moléculaire. De plus, le temps de simulation nécessaire pour échantillonner les différentes conformations significatives du récepteur est un problème supplémentaire.

La démarche utilisée dans ce travail est plus simple, elle vise à utiliser les informations contenues dans la PDB, d'une manière à obtenir un jeu de conformations de base, représentatif de différents états possibles de la protéine. Ainsi, les résultats obtenus montreront *i)* une certaine représentation de la plasticité du récepteur, et *ii)* cette représentation est liée à l'espace chimique des ligands co-cristallisés (à la différence d'une modélisation sur l'apoenzyme).

II.5 Définition d'un filtre *in silico*

Dans le contexte de docking 4D, l'objectif est la mise au point d'un filtre pour l'arrimage moléculaire. L'hypothèse admise est que la classification structurale obtenue, permette de distinguer entre ligands potentiellement agonistes ou antagonistes. Autrement dit, un ligand antagoniste devra s'arrimer mal dans un site classifié comme ayant une conformation favorable à des ligands agonistes, et vice versa.

Avant d'engager la férutinine dans les expériences d'arrimage moléculaire, la première étape de l'étude consiste à optimiser les paramètres de calcul sous MVD, de manière à modéliser le mieux possible ce système. L'ensemble des calculs et des analyses post-calcul définira le filtre *in silico*.

Ce filtre comprend la protéine de référence (plus précisément son site de liaison), les ligands connus des REs et les paramètres de recherche utilisés dans les calculs.

II.5.1 Site de liaison

Puisque le site de liaison est relativement large, nous avons défini une zone bien précise englobant tous les résidus qui pourront impacter le calcul, pour un site de nature agoniste ou antagoniste. Cette zone comprend une cavité (rayon moyen de 17 Å) dans laquelle les ligands sont présents, et son environnement qui entre en interaction avec les résidus d'acides aminés flexibles.

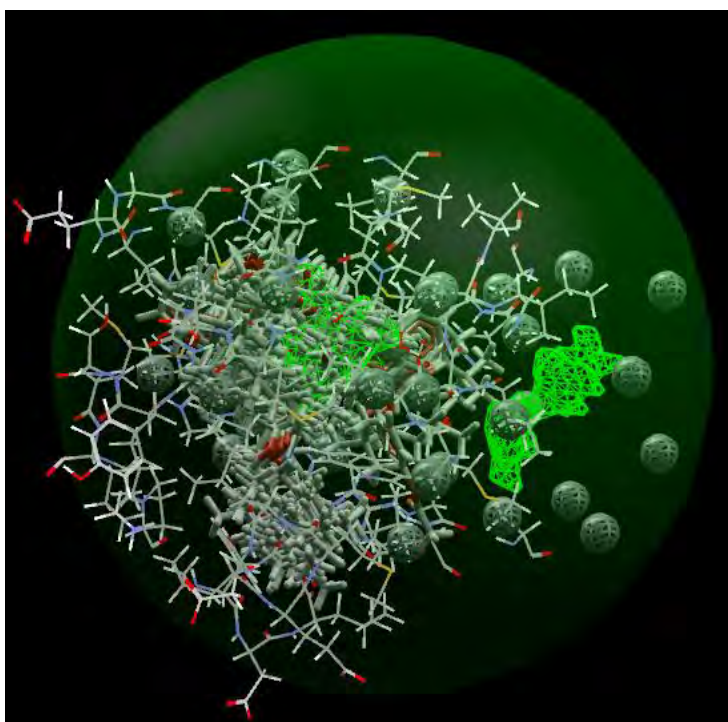


Figure 38 : Les composants du système utilisé dans le calcul. La figure englobe la sphère de recherche (grande sphère, vert clair), la cavité (vert fluorescent), la protéine 1G50 (stick blanc, rouge et bleu), les ligands (wireframe blanc) et les résidus d'acides aminés flexibles (petite sphères grises).

L'espace de recherche est une sphère centrée sur le domaine de calcul englobant largement toutes les boucles hypervariables et permettant la libre orientation de tous les ligands (Figure 38). Le choix de cette zone est lié au fait que les résidus impliqués se retrouvent dans l'ensemble des conformations de sites de liaison des conformations canoniques.

Le site de liaison des REs étant constitué d'un grand nombre d'acides aminés. La sélection des acides aminés qui composent ce site est critique car ce choix orientera les calculs et les résultats dans ce cas d'arrimage moléculaire.

Les résidus qui entrent en interaction avec le ligand ont été sélectionnés. Ces résidus sont constants quelle que soit la protéine choisie. Un site constitué des 33 résidus flexibles suivants a été donc défini : Ala 350, Arg 394, Glu 323, Glu 353, Gly 390, Gly 521, His 524, Ile 326, Ile 386, Ile 424, Leu 327, Leu 346, Leu 349, Leu 354, Leu 384, Leu 387, Leu 391, Leu 428, Leu 525, Leu 540, Lys 449, Met 343, Met 357, Met 388, Met 421, Phe 404, Phe 425, Phe 445, Pro 324, Thr 347, Trp 360, Trp 383, Trp 393.

II.5.2 Flexibilité et plasticité

Un système constitué d'un ligand et d'une protéine à la fois flexibles ont été utilisés dans ce travail. En effet, la combinaison de la flexibilité des protéines-ligands représente une approche plus réaliste du phénomène de reconnaissance moléculaire produit naturellement entre le ligand et sa cible. En revanche, elle peut introduire des biais dans les interprétations, si les résultats sont traités de la même manière qu'un arrimage avec une protéine "rigide", car les faux positifs peuvent être plus nombreux. D'autre part, la flexibilité des résidus a tendance à procurer les résultats en cas d'arrimage (docking 4D) sur une collection de structures protéiques. Cet effet doit être pris en compte au niveau du paramétrage (flexibilité restreinte).

L'utilisation de plusieurs structures pour les calculs du docking à la place d'une seule structure protéique représente une voie pour l'introduction de la flexibilité dans le complexe protéine-ligand. Les résultats obtenus seront alors interprétés en vue de sélectionner la structure protéique optimale qui arrivera à ajuster la molécule en optimisant au mieux ses propres coordonnées (Huang SY *et al.*, 2007).

II.5.3 Choix des paramètres de calcul

Le choix d'un paramètre dépend de sa contribution à reproduire la cristallographie des ligands présents dans les structures canoniques. L'analyse des résultats se réalise suivant deux facteurs expérimentaux :

- Les valeurs des scores correspondent à des contributions énergétiques définies par l'équation suivante : $E_{\text{score}} = E_{\text{inter}} + E_{\text{intra}}$. Où E_{inter} est la contribution issue de l'interaction entre la protéine et le ligand et E_{intra} est la contribution liée à l'énergie interne du ligand (Mesmoudi M *et al.*, 2012).

- La valeur du RMSD qui représente la valeur de l'écart moyen de la distance entre deux atomes du ligand contenu dans le cristal et ceux des molécules arrimées.
- Les meilleures poses sélectionnées correspondent aux meilleurs scores (ou au moins de l'un des deux scores) et à des bonnes valeurs du RMSD.

Un bilan des interactions atomiques (liaisons hydrogènes, hydrophobes, électrostatiques) a été aussi effectué. Une annotation a également été faite concernant la conformité des poses. L'étude structurale permet de définir le groupe phényle comme étant important. Lorsqu'il est présent, il est dans une orientation spécifique et très conservée (interaction avec les résidus Phe 404 et Glu 353). La conformité est un descripteur qualitatif qui peut être transformé en une métrique plus quantitative, par exemple : RMSD partiel²³ sur ce groupe.

Les calculs sont effectués avec deux modalités supplémentaires :

- Le ligand et le récepteur sont flexibles. La flexibilité du récepteur est prise à la fois *i)* en compte dans le docking et *ii)* par une minimisation post-docking du ligand, des chaînes latérales des résidus définis précédemment, et du «backbone» de la protéine.
- L'utilisation de profils pharmacophoriques (« *template docking* »), par exemple, le groupe phényle (Spare NS *et al.*, 2008).

II.5.4 Profils pharmacophoriques

Les profils pharmacophoriques correspondent à des contraintes de calcul, dont le poids se gère avec plusieurs paramètres. Les pharmacophores sont définis à partir de l'analyse structurale grâce à la superposition des protéines qui induit la superposition des ligands dans le site de liaison. Si pour plusieurs structures de ligands, la même fonction chimique au même endroit est retrouvée, ce groupe (par exemple : groupement hydroxyle, cycle aromatique, ...) est possiblement important. Lorsque ce groupe est impliqué dans des interactions essentielles (par exemple des interactions π - π avec un résidu aromatique ou l'échange de liaisons hydrogènes) pour l'association protéine ligand, les atomes qui le constituent correspondent à un ensemble position-orientation-conformation qui n'est pas dû au hasard.

On cherchera alors *i)* à reproduire cette géométrie dans le calcul, *ii)* à la sélectionner de manière systématique dans les résultats (conformité), ou *iii)* à combiner les deux options précédentes, sans pour autant introduire des biais, ce qui signifie que les contraintes doivent

²³ Mais pour atteindre cet objectif, il aurait fallu développer un logiciel spécifique, ce qui sort du cadre de ce travail, le critère qualitatif étant suffisant à ce stade.

être présentes pour orienter les calculs mais en préservant la possibilité d'obtenir un nombre significatif de solutions différentes.

La Figure 39 montre la définition du profil pharmacophorique et quelques ligands, après alignement dans la structure des RE α (les RE β suivant une méthodologie similaire).

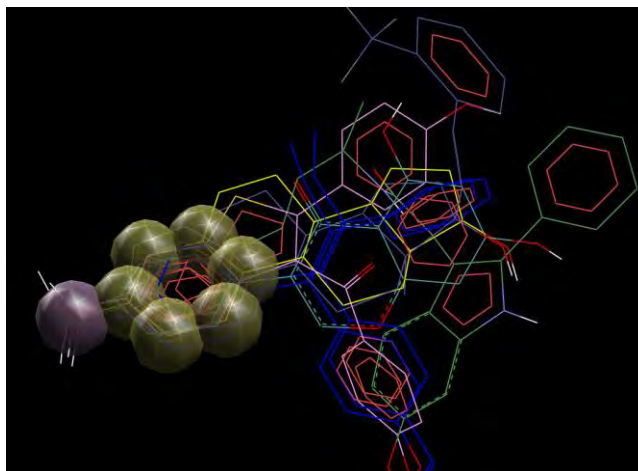


Figure 39 : Profil pharmacophorique utilisé pour le « *template docking* ».

La superposition du groupe phénolique (à gauche de la figure) pour les molécules affichées, est constatée. Ce groupe est donc utilisé pour définir les contraintes qui vont favoriser tel ou tel type d'atome à une position donnée, dans un volume particulier, avec une certaine force (paramétrage au moyen d'une fonction continue décroissante du centre de contrainte vers l'extérieur).

La Figure 39 présente des volumes sphériques de 1,8 Å de rayon qui matérialisent les centres de contraintes (attraction à cette position) pour différents types d'atomes :

- Les atomes donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène sont présents : l'atome d'oxygène du groupe OH (sphère violette).
- Les atomes faisant partie d'un cycle ou ayant une importance stérique : les 6 atomes de carbones du cycle phényle.

La force sur les atomes définissant le terme stérique est fixée à la moitié de sa valeur sur les 3 autres types d'atomes. Il s'agit d'un paramétrage standard sous MVD, qui est connu pour éviter des contraintes trop fortes. L'ensemble de ces atomes et de ces termes constitue le profil pharmacophorique (« *template* » dans la terminologie MVD).

A l'utilisation, ce template (assez limité puisqu'il ne concerne que la partie phénolique très conservée des ligands) n'impacte que peu sur la variété des poses produites lorsque le nombre de runs indépendants est augmenté.

L'utilisation de profils pharmacophoriques permet de définir un score supplémentaire (« *similarity score* »). Ce terme sera d'autant plus fort que le groupe phényle d'un ligand est superposable avec le pharmacophore correspondant. Par contre, il s'avère assez difficile à interpréter en pratique car ce pharmacophore semble faire intervenir d'autres contributions qui contrebalancent la valeur finale. Dans ce travail nous nous sommes donc limités à l'observation visuelle pour définir un critère qualitatif de conformité.

La conformité définit une superposition plus ou moins évidente des groupes phényles (pharmacophore vs ligand) mais aussi de l'orientation du ligand dans le site et de sa position générale par rapport au plan de l'œstradiol. Lors de la mise au point des conditions de calcul, les résultats ont montré que les poses sont plus conformes (et sont affectées de meilleures valeurs de RMSD ou scores) avec une procédure de « *template docking* ». Les profils pharmacophoriques ont été mis en œuvre de manière systématique dans l'ensemble des calculs.

II.5.5 Validation du filtre

Le système de calcul choisi doit être validé avant d'engager la férutinine dans les divers calculs du docking. Autrement dit, le filtre a été appliqué aux ligands co-cristallisés trouvés dans les structures canoniques, et ça dans le but de reproduire la conformation observée dans le site de liaison de la structure correspondante. Quant aux autres protéines, si elles font partie de la même classe (agoniste ou antagoniste) nous espérons reproduire avec une certaine déviation, la conformation cristallographique. Il s'agit donc d'un filtre qui utilise des éléments vrais/faux en fonction de ce que l'on observe, quant aux scores, ils seront complexes à interpréter car nous travaillons sur un jeu de protéines différentes. Cependant, nous espérons obtenir les meilleurs scores (ou des poses fortes) lorsque les poses sont conformes (dans le cas de la protéine qui co-cristallise le ligand ou celui d'une protéine de la même classe). De même, de mauvais scores et une mauvaise conformité dans le cas des autres structures protéiques pour un ligand donné, sont attendu.

Dans le cas où l'ensemble des conditions est respecté, nous disposerons d'un filtre efficace qui sera utilisé pour le docking de la férutinine dans les mêmes structures typiques.

II.5.5.1 Descripteurs utilisés pour l'évaluation et résultats

Les tableaux ci-dessous (Tableau 16 et Tableau 17) illustrent les résultats du docking *i)* pour les ligands (EST, AIT, OHT, IOG, GW5, EZT) dans les 6 structures ER α canoniques (Tableau 14 pour les structures chimiques) retenues et *ii)* pour les ligands (RAL, 797, GEN, IOG, EST) dans les 5 structures ER β canoniques (

Tableau 15 pour les structures chimiques). Les tableaux de résultats s'interprètent avec les règles suivantes :

- Chaque tableau se décompose en lignes correspondant à un ligand (colonne *ligand*), puis sur chaque ligne les 5-6 structures canoniques (colonne *structure*) utilisées pour l'arrimage du ligand.
- Un code couleur associe les structures et leur ligand co-cristallisé, par exemple EST dans la structure 1G50a en bleu.
- Sur une série de 10 calculs (runs) indépendants, pour chaque ligand et pour chaque structure protéique, seuls le meilleur score MolDock (colonne MolDock) et le meilleur score Rerank (colonne Rerank) sont retenus. Les scores sont exprimés en unités arbitraires.
- Si le ligand n'est pas arrimé, (*a minima* un ligand positionné dans la cavité du site de liaison, indépendamment de sa conformation) la valeur des scores n'est pas mentionnée dans la table.
- La colonne *RMSD* indique la valeur de ce descripteur lorsqu'il est possible de le calculer. Cette valeur est calculée par rapport à la position du ligand dans sa structure de référence. Par exemple, EST arrimé dans 1XPC_, sera comparé à EST co-cristallisé avec 1G50a. Ces mesures sont possibles *i)* car toutes les protéines sont alignées dans le même espace de référence et *ii)* cet alignement est très similaire (Figure 32) dans cette protéine.
- Pour un run donné, si la pose affectée du meilleur score MolDock et celle correspondant au meilleur score Rerank sont les mêmes, la colonne *Pose forte* est positionnée à 'Oui'.
- La colonne *CBP* est positionnée 'Oui' si la meilleure pose MolDock est considérée comme conforme (superposition totale/partielle des groupes phénoliques de la pose et de la conformation cristallographique).
- La colonne *CPC* marque le nombre (0-10) de poses conformes identifiées par blocs de 10 runs indépendants.

Tableau 16 : Reproduction de la cristallographie des ligands des structures canoniques du RE α .

Structure	Ligands	MolDock	Rerank	RMSD	CBP	Pose forte	CPC
1G50a	EST	-109	-93	0,63	Oui	Oui	9
	AIT	-100	35	4,31	Oui	Oui	1
	IOG	-	-	-	-	-	0
	EZT	-	-	-	-	-	0
	GW5	-	-	-	-	-	0
	OHT	-85	143	4,65	Non	Oui	6
1XPC_	EST	-71	17	2,59	Oui	Oui	10
	AIT	0,6	443	2,65	Oui	Non	2
	IOG	-	-	-	-	-	0
	EZT	-	-	-	-	-	0
	GW5	-111	-63	4,67	Oui	Oui	10
	OHT	-88	38	1,82	Oui	Oui	10
2IOG_	EST	-68	-15	1,32	Oui	Oui	10
	AIT	-176	-144	0,65	Oui	Oui	10
	IOG	34	104	2,80	Oui	Non	2
	EZT	-	-	-	-	-	0
	GW5	-	-	-	-	-	0
	OHT	-130	-78	1,09	Oui	Oui	5
2P15bR	EST	-94	-82	0,46	Oui	Oui	10
	AIT	-0,45	602	2,00	Oui	Non	1
	IOG	-	-	-	-	-	0
	EZT	-132	-99	1,23	Oui	Oui	10
	GW5	-	-	-	-	-	0
	OHT	-	-	-	-	-	0
1R5KaR	EST	-99	-84	3,06	Oui	Oui	9
	AIT	-	-	-	-	-	0
	IOG	-	-	-	-	-	0
	EZT	-	-	-	-	-	0
	GW5	-102	-56	1,54	Oui	Oui	8
	OHT	-73	135	1,71	Oui	Oui	7
3ERT_	EST	-73	-45	6,79	Non	Oui	0
	AIT	-132	26	1,32	Oui	Oui	4
	IOG	313	2612	4,48	Oui	Non	1
	EZT	-	-	-	-	-	0
	GW5	-93	-45	1,48	Oui	Oui	3
	OHT	-123	-6,5	1,45	Oui	Oui	10

La colonne *Pose forte* indique le critère d'efficacité et les colonnes *CBP* et *CPC* désignent le critère de conformité (*CPC* correspondant également à un indicateur de stabilité).

Chaque ligand s'arrime bien dans son site de liaison avec de bons scores et de bonnes valeurs de RMSD. A titre d'exemple, dans le cas d'une structure canonique de classe '**agoniste**' du RE α (1G50a), le ligand naturel s'arrime bien dans son site avec un RMSD de 0,63 Å et des scores MolDock/Rerank de -103/-82 respectivement. La conformation de la pose calculée est très proche de celle donnée par la cristallographie (l'écart RMSD est très petit). Dans le cas d'une structure canonique de classe '**antagoniste**' du RE α (3ERT_), le ligand OHT s'arrime bien dans son site avec un RMSD assez bas de 1,45 Å et des meilleures énergies. Ces résultats favorables sont marqués par des flèches obliques dans les deux tableaux.

Des problèmes dans ce calcul peuvent s'opposer, par exemple le ligand IOG qui a du mal à s'arrimer dans sa structure de référence 2IOG_. Un autre exemple est celui du ligand AIT qui s'arrime mieux dans le site de 2IOG_ (10 poses conformes) que dans son site 1XPC_ (2 poses conformes) de référence.

Tableau 17 : Reproduction de la cristallographie des ligands des structures canoniques du RE β .

Structure	Ligands	MolDock	Rerank	RMSD	CBP	Pose forte	CPC
1QKN_	Ral	-125	13	1,61	Oui	Oui	7
	797	-	-	-	-	-	0
	Gen	-91	-48	2,40	Oui	Oui	10
	IOG	-109	-109	6,59	Oui	Oui	10
	EST	-105	-88	2,94	Oui	Oui	10
1U3Sa	Ral	-	-	-	-	-	0
	797	-74	166	2,58	Oui	Non	10
	Gen	-	-	-	-	-	0
	IOG	-118	-100	1,61	Oui	Oui	7
	EST	-	-	-	-	-	0
1X7R_	Ral	-	-	-	-	-	0
	797	-112	-90	1,96	Oui	Oui	10
	Gen	-90	-21	1,71	Oui	Oui	10
	IOG	-111	-94	1,78	Oui	Oui	10
	EST	-94	-76	1,10	Oui	Oui	10
2I0Jc	Ral	-61	197	2,59	Oui	Oui	4
	797	-113	-82	2,32	Oui	Non	9
	Gen	-94	-86	1,73	Oui	Oui	10
	IOG	-94	-81	3,32	Oui	Oui	10
	EST	-91	-75	2,01	Oui	Oui	10
2YJA_	Ral	-	-	-	-	-	0
	797	-36	313	3,14	Oui	Oui	10
	Gen	-103	-84	1,97	Oui	Oui	10
	IOG	-96	-72	2,11	Oui	Oui	10
	EST	-104	-87	1,85	Oui	Oui	10

Ces résultats peuvent être expliqués en partie par le fait que certains ligands de grande taille peuvent avoir des difficultés à s'arrimer dans des sites correspondant à de petits volumes de cavité (typiquement IOG dans 1G50a). D'autre part, des ligands de petite-moyenne taille s'arrimeront plus facilement dans les structures dont le site de liaison est caractérisé par un grand volume. Par contre, dans ce cas, lorsque les valeurs de $CPC > 5$, un signal fort apparaît. L'arrimage sera donc spécifique d'une partie du site de liaison, même si le ligand peut être considéré comme un fragment vis-à-vis de cette conformation du site.

Ce filtre *in silico* doit être considéré d'une manière globale et perfectible, mais il rend assez bien compte de manière qualitative de la réalité. Le filtre a ses limites et montre des déviations (du bruit) dans les résultats de calcul. Cela montre que les contraintes appliquées sont suffisamment lâches pour ne pas orienter systématiquement les calculs vers l'association

entre le ligand et sa structure de référence. Ce protocole de calcul sera donc utilisé pour le docking de la férutinine dans le site des récepteurs RE α et RE β .

II.6 Cas de la férutinine

La férutinine est agoniste du RE α et agoniste/antagoniste du RE β (Ikeda K *et al.*, 2005). Pour essayer d'expliquer structuralement ce double rôle, l'arrimage de la férutinine a été effectué dans les six structures canoniques du RE α et dans les cinq structures canoniques du RE β . En attendant quelques résultats obtenus sur la férutinine aideront dans la conception-synthèse des molécules dérivées de la férutinine, antagonistes des récepteurs.

II.6.1 Cas du RE α

Les acides aminés du site actif des REs sont en interaction continue avec la férutinine pour stabiliser sa liaison dans la cavité et ceci par le biais des liaisons hydrogènes et des interactions stériques. Ces interactions sont majoritairement de types hydrophobes surtout au niveau du motif daucane (Leu 525, Ile 424, Phe 404, Met 421, Met 343). Par contre, il existe quelques interactions hydrogènes au niveau des deux fonctions hydroxyles et du carbonyle de l'ester (Glu 353, Gly 521, His 524). La cartographie des interactions de la férutinine dans le site de liaison des récepteurs est représentée dans la figure suivante (Figure 40) :

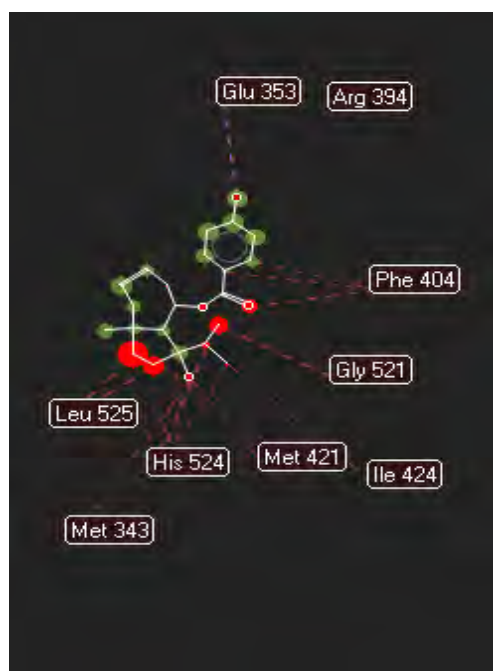


Figure 40 : Interactions de férutinine (FRT) avec les acides aminés dans le site actif du RE α .

La férutinine est ensuite arrimée dans chacune des six structures typiques du RE α . Puisqu'elle ne possède pas une structure cristallographique, la valeur du RMSD n'a plus de

signification, mais nous pouvons toujours utiliser les descripteurs de conformité *CBP* et *CPC* utilisés dans la section précédente.

Le Tableau 18 présente les résultats des calculs d'arrimage (dans les mêmes conditions que dans la section précédente). Un descripteur (colonne *Hit*) supplémentaire a été ajouté : la valeur de *Hit* est définie à 'High' quand MolDock ≤ -100 et Rerank ≤ -50 et *CPC* > 8 et *CBP* est positionné à 'Oui'. Ce descripteur résume toutes les conditions définies précédemment qui caractérisent l'arrimage optimal. Pour que ce descripteur ne soit pas du type tout ou rien, une valeur médiane a été ajoutée. *Hit* est positionné à 'Low' quand les conditions précédentes sont satisfaites à l'exception de Rerank score ≤ 20 ou *CPC* ≥ 5 .

Les cellules correspondant aux colonnes MolDock et Rerank sont colorées. Si les deux valeurs sont colorées en rouge foncé (Tableau 18, structure 2P15bR) cela signifie que les scores sont les meilleurs des 10 runs pour la même pose, autrement dit il s'agit d'une pose forte (ce type de coloration sera également utilisé dans le chapitre suivant).

Tableau 18 : Résultats d'arrimage moléculaire de FRT dans le RE α .

Structure	Classe	MolDock	Rerank	CPC	CBP	Hit
2IOG	agoniste/antagoniste	-92,33	-2,02	10	Oui	-
3ERT	antagoniste	359,23	2581,35	0	Non	-
1R5KaR	antagoniste	-96,97	17,85	7	Oui	-
1XPC	antagoniste	-92,35	-8,79	2	Non	-
1G50a	agoniste	-118,20	-57,28	9	Oui	High
2P15bR	agoniste	-114,07	-81,05	9	Non	High

La figure suivante (Figure 41) affiche les poses du Tableau 18 dans les sites de chaque structure canonique des RE α , accompagnées des ligands co-cristallographiques à titre de comparaison. Toutes les structures sont alignées de la même manière et leurs plans de coupe (« *clipping planes* ») sont strictement superposables dans l'espace.

Dans les cas de 1G50a et 2P15bR on constate que la liaison de la férutinine au RE α est favorisée en position agoniste. Il s'agit de deux sites de liaison dont le volume est restreint. Il est à noter que si les poses sont conformes dans les deux cas (partie phénolique), la férutinine n'adopte pas la même conformation du cycle daucane, ce qui projette les fonctions alcool d'une manière différente. Les scores MolDock sont similaires avec une plus forte sensibilité du score Rerank ce qui pourrait donner un indice sur une conformation à favoriser (2P15bR) ou l'oxygène *sp*² de la fonction ester est dirigé vers le haut de la figure.

Lorsque le volume du site augmente, la férutinine perd sa capacité à se positionner correctement dans le site. C'est le cas de la structure 3ERT_ et de la structure 1XPC_ où l'on observe respectivement une conformation très contrainte de la férutinine (3ERT_) et une

conformation où la partie phénolique s'aligne dans le canal (1XPC_) vers le bas du site. Un cas intéressant est observé, c'est celui de la structure 2IOG_, qui correspond à un site relativement grand possédant des extensions dans le plan vertical à travers la poche C. Dans ce cas, la férutinine se positionne correctement dans le plan horizontal (de l'œstradiol, EST) du site mais tend aussi à remplir le canal de la poche C. Une conformation (partie phénolique, oxygène *sp*² de la fonction ester, cycle daucane et substituants) de la férutinine similaire à celle de 2P15bR est alors observée.

La férutinine possède une petite structure plane en comparaison avec l'IOG (ligand de 2IOG_) et l'OHT (ligand de 3ERT_). Ceci peut expliquer son incapacité à occuper la poche C du plan vertical du site. Une solution serait d'augmenter la taille de la férutinine pour qu'elle puisse remplir la poche C d'une façon identique aux antagonistes. Par contre, malgré le volume du site de la structure 1R5KaR, la férutinine arrive à adopter une conformation conforme, occupant l'enveloppe de l'estradiol et décalée par rapport au ligand co-cristallisé.

Au final, les scores Rerank sont retenus, car ils sont assez représentatifs de ce qu'il est possible d'observer par un examen de chaque pose (Tableau 18). Les structures agonistes sont favorisées, mais la férutinine est capable de lier des cavités de classe antagoniste, de manière conforme ou non, et des scores moins favorables.

La plupart des poses sélectionnées correspondent à des poses fortes d'où les calculs semblent stables de la férutinine.

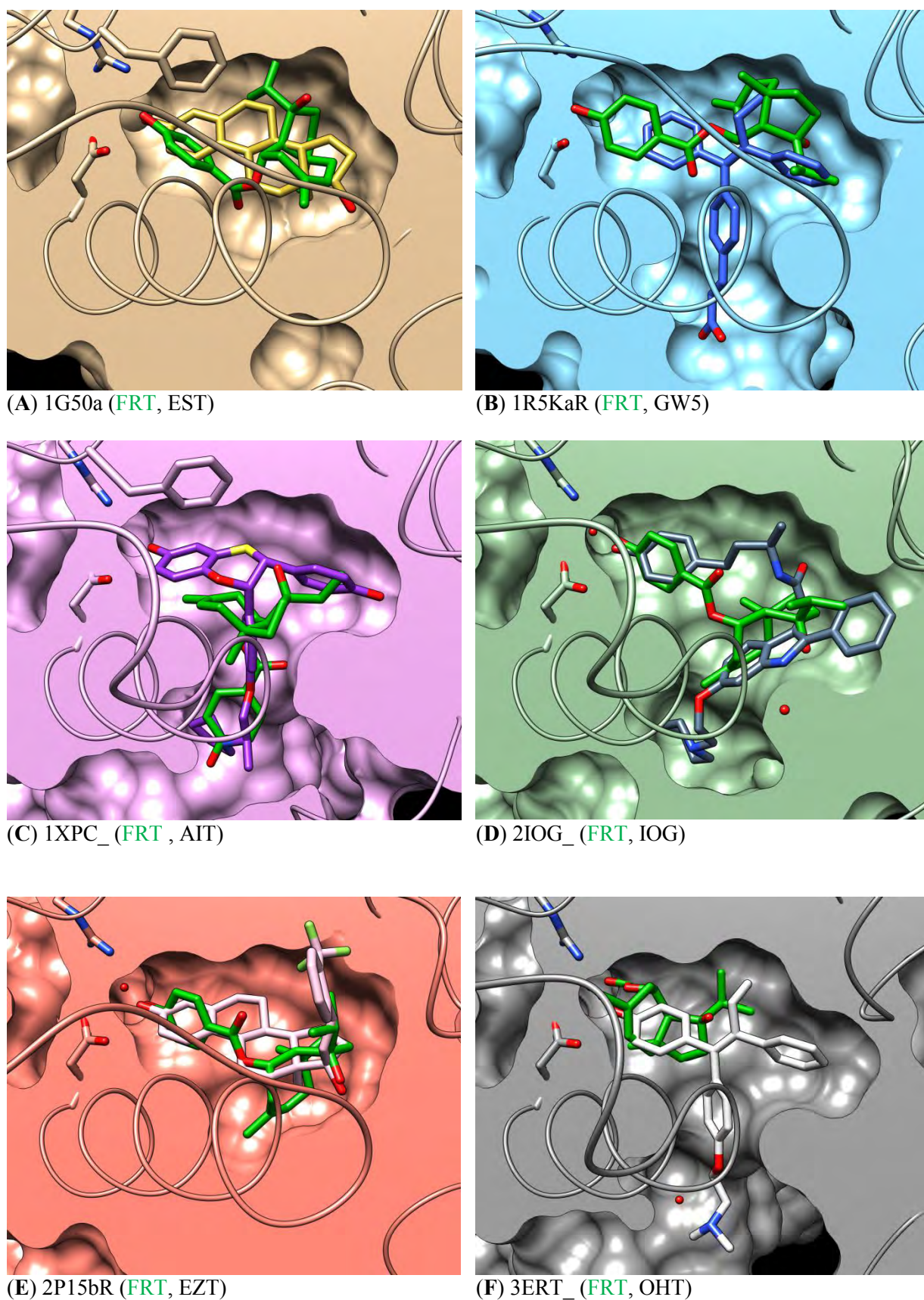


Figure 41 : Positionnement de férutinine dans les structures canoniques des RE α . Les ligands co-cristallisés (code PDB à 3 lettres, couleurs diverses) et la férutinine (FRT, vert) sont indiqués (parenthèses) dans chaque cas.

II.6.2 Cas du RE β

Les interactions des acides aminés avec la férutinine dans le site actif du RE β sont identiques à celles du RE α . Les interactions hydrophobes au niveau du motif daucane sont : Leu 384, Leu 525, Ile 424, Phe 404, Met 421, Met 343, Met 388, His 524. Les interactions (liaisons hydrogènes) au niveau des deux fonctions hydroxyles et du carbonyle de l'ester sont : Glu 353, Gly 521, Arg 394 (Figure 42).

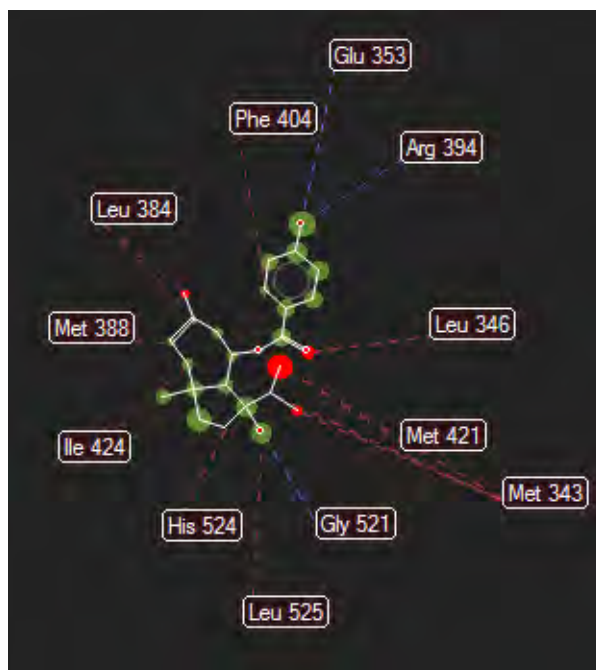


Figure 42 : Interactions de férutinine avec les acides aminés dans le site actif du RE β .

Le Tableau 19 suivant représente les valeurs des scores dans le cas d'arrimage moléculaire de la férutinine dans le site du RE β . La Figure 43 affiche les poses du Tableau 19 dans les sites de chaque structure canonique des RE β , accompagnées des ligands co-cristallographiques, dans les mêmes conditions que dans la section précédente.

Tableau 19 : Résultats d'arrimage moléculaire de FRT dans le RE β .

Structure	Classe	MolDock	Rerank	CPC	CBP	Hit
1QKN	antagoniste	20,22	611,41	3	Oui	
1X7R	agoniste/antagoniste	-134,22	-92,26	9	Oui	High
2I0Jc	agoniste	-128,57	-81,96	9	Oui	High
2YJA	agoniste	-118,45	-19,07	8	Oui	Low
1U3Sa	agoniste	-101,26	71,13	3	Oui	

Les meilleurs résultats sont obtenus dans le cas de 1X7R $_$ et 2I0Jc $_$ (Hit= High) et de 2YJA $_$ (Hit= Low au lieu de High, à cause de la la valeur de CBP= 8 au lieu de 9). Il s'agit de sites de classe agoniste et agoniste partiel de volume différents (contraint pour 1X7R $_$ et 2YJA $_$ et ouvert pour 2I0Jc). Les scores sont en faveur de 1X7R $_$ et 2I0Jc, et la conformation des poses est très similaire dans ces deux cas.

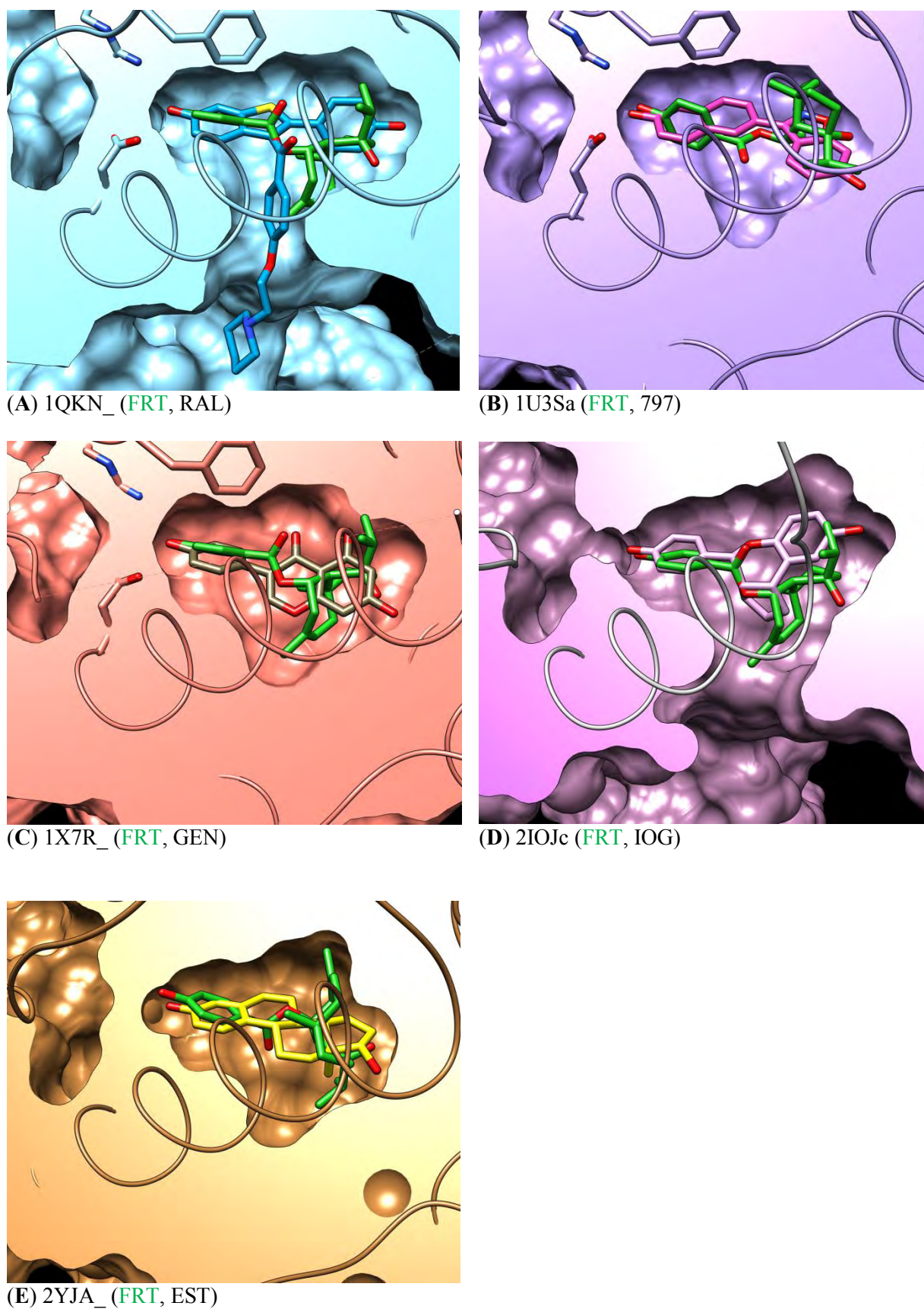


Figure 43 : Positionnement de la férutinine dans les structures canoniques des RE β . Les ligands co-cristallisés (code PDB à 3 lettres, couleurs diverses) et la férutinine (FRT, vert) sont indiqués (parenthèses) dans chaque cas.

Cette même conformation (partie phénolique, oxygène de la fonction ester vers le haut de la figure, cycle daucane et substituants) est retrouvée dans le cas de la structure 1QKN_. On peut signaler au passage, cette conformation était voisine de celle de la pose obtenue avec les structures 2P15bR / 2IOG_ dans le cas des RE α .

Les résultats obtenus dans le cas de 1U3Sa semblent difficiles à interpréter, la conformation de la pose est inédite bien que conforme.

Il est remarquable que dans le cas des RE β la férutinine soit capable de s'arrimer dans la cavité haute (plan de l'œstradiol) d'un site fermé (contrainte) de classe agoniste ou ouvert avec un canal (antagoniste ou antagoniste partiel). En revanche, les mauvais scores obtenus avec 1QKN_ doivent modérer le propos pour interpréter les résultats d'une manière plus globale. Dans le cas des RE β , la férutinine s'arrime donc dans des structures agonistes et potentiellement peut s'arrimer dans des structures antagonistes.

Les bons scores pourraient s'expliquer par le fait que la férutinine soit capable d'occuper toute la cavité d'un site agoniste, on le voit nettement dans le cas de la structure 1X7R_ par rapport au ligand, la génistéine (GEN). A comparer avec les scores moins bons obtenus avec GEN dans le cas de la même structure de référence.

Par contre dans les sites purement antagonistes, la férutinine, limitée en taille par rapport à des molécules en forme de T (« *T-Shaped* ») est incapable de progresser vers le canal.

De ce point de vue, le cas de 2I0Jc de classe agoniste, qui arrime bien la férutinine, est intéressant : le site est ouvert mais la molécule de référence (IOG) est une petite molécule qui ne couvre pas le canal.

Tenant en compte les résultats obtenus pour la férutinine, des analogues à ce composé ont été choisis d'hémisynthétiser. Les résultats du docking de ces molécules dans le site des récepteurs RE α et RE β seront exposés après leur hémisynthèse dans le chapitre 3.

II.7 Conclusions et perspectives

En conclusion, les essais d'arrimage de la férutinine (agoniste dans les sites RE α , agoniste et potentiellement antagoniste dans les sites RE β) ont confirmé structuralement les données de la littérature, ceci en justifiant en partie la double fonction agoniste/antagoniste que possède la molécule vis-à-vis des récepteurs aux œstrogènes.

Le caractère pur antagoniste des molécules semble être retrouvé lorsque la poche C du site est occupée. La seule contrainte à ce niveau est la position correcte de la partie phényle

dans le plan horizontal du site orientée vers le canal et la poche B. Ceci orientera la synthèse chimique vers des analogues plus volumineux en taille que la férutinine avec un changement de la substitution sur le groupement phényle.

La conception de ces analogues repose alors essentiellement sur une approche rationnelle qui combine différentes informations de la littérature. Une liste a été conçue impliquant des réactions rapides, chimiquement faisables sur le jaeschkenadiol, tout en préservant la partie phényle de la férutinine mais en faisant varier les substitutions sur ce groupement. Cette famille d'analogues a été soumise au filtre *in silico* pour les deux récepteurs.

Les méthodes *in silico* sont complémentaires des études *in vivo* et *in vitro* sur les perturbateurs endocriniens et ne peuvent remplacer l'expérience. Elles apportent des informations sur la nature des interactions chimiques entre les perturbateurs et les récepteurs et sont nécessaires à la bonne compréhension de ces mêmes mécanismes. Par la suite, de telles études peuvent être utilisées dans le développement de nouvelles expériences ou lors de la sélection de molécules à tester. En d'autres termes, l'utilisation combinée de la théorie et de l'expérience engendrera une meilleure compréhension des phénomènes traités dans un domaine de recherche.

Cette étude d'arrimage moléculaire apporte des éléments de compréhension du système de fixation des ligands aux récepteurs aux œstrogènes.

Le filtre adopté pour les calculs du docking après optimisation de ses paramètres s'est avéré efficace puisqu'il a reproduit les données cristallographiques des ligands dans leur site de liaison protéique. Les résultats du docking de la férutinine ont confirmé d'une part sa double fonction biologique (agoniste/antagoniste) vis-à-vis des REs et ont servi d'autre part de plateforme pour l'orientation de la synthèse de ses analogues.

Pour autant, il restera à obtenir une confirmation issue de données cristallographiques (structure Rayon X) concernant la férutinine ou un des analogues ayant manifesté, à la fois, de bons résultats en termes d'arrimage et de tests *in vitro*.

III Hémisynthèse et docking des analogues de la férutinine

La conception d'analogues de la férutinine a été guidée à la fois par les données relatives à l'arrimage moléculaire et par les relations structure/activité disponibles dans la littérature. Ainsi, l'arrimage moléculaire a montré l'importance d'encombrer la férutinine pour pouvoir remplir la poche C du site de liaison, tout en préservant la partie phényle de la molécule qui est importante pour son ancrage aux REs. En effet, ce groupe phényle substitué ou phénol est quasi-systématiquement conservé dans les conformations de ligands co-cristallisés, une fois que les structures correspondantes sont alignées (sur la structure de référence 1XPC_) avec les procédures décrites dans le chapitre précédent. La Error! Reference source not found. montre de tels alignements de ligands dans le cas des RE α (gauche) et RE β (droite) dans deux structures²⁴ (3ERT_ et 1QKN_ respectivement) dont le site de liaison est ouvert (canal dirigé vers le bas).

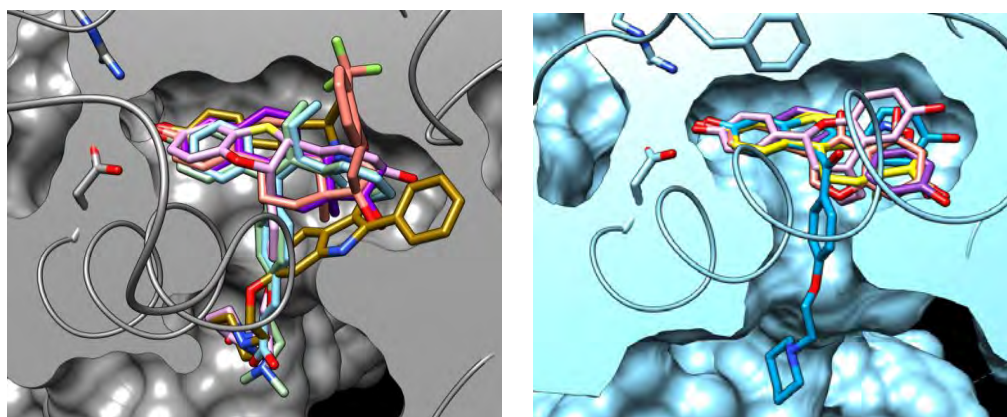


Figure 44 : Conservation des conformations de ligands dans les récepteurs RE α / β . De manière à simplifier l'affichage, les ligands sont restreints aux 6 structures canoniques des ER α et aux 5 structures canoniques des RE β , telles qu'elles ont été déterminées dans la classification structurale. **RE α (gauche)** : Ligands EST (violet, 1G50a) ; GW5 (bleu, 1R5Ka) ; IOG (or, 2IOG_) ; EZT (orange, 2P15b) ; OHT (vert, 3ERT_) dans le site de liaison de 3ERT_. **RE β (droite)** : Ligands RAL (bleu, 1QKN_) ; 797 (violet, 1U3Sa) ; GEN (saumon, 1X7R_) ; IOG (rose, 2IOJc) ; EST (jaune, 2YJA_) dans le site de 1QKN_.

²⁴ Rappelons quelques conventions : le code PDB d'une structure correspond à 4 lettres/chiffres (par exemple 1G50), ici en majuscules. Lorsque ce code est suivi d'une lettre '_' (par exemple 1XPC_) cela signifie que la structure PDB ne comporte qu'une sous unité (une chaîne polypeptidique). Lorsque le code est suivi d'une lettre en minuscule (par exemple 2P15b) cela signifie que la structure PDB incluait plusieurs sous-unités, même si fonctionnellement la protéine correspond à un monomère. Ces sous-unités sont identifiées par des lettres de A à Z, la convention utilisée indique que dans le cas de 2P15, c'est la chaîne B qui est issue de la classification structurale et qui est utilisée pour les calculs, d'où 2P15b. La lettre R après le code PDB et l'identifiant de chaîne, indique qu'une partie de la protéine a été reconstituée *in silico* (*re-engineered*) pour que les calculs (ou les alignements de structures) soient possibles (par exemple 2P15bR ou 1R5KaR). Dans le cadre de cette étude, ces parties reconstruites (typiquement des boucles de quelques résidus) ne sont pas incluses dans le périmètre du site de liaison.

D'autre part, il est important de conserver le cœur daucane renfermant la double liaison cruciale pour l'activité cytotoxique. Nous avons donc choisi de nous intéresser à la série de molécules suivantes dont certaines ont déjà été testées pour leurs activités œstrogéniques ou anti-œstrogéniques. Ces composés seront ensuite testés pour leur activité cytotoxique vis-à-vis des lignées cellulaires cancéreuses hormono-dépendantes. Dans une première approche, ces molécules ont aussi été retenues pour leur facilité d'accessibilité par hémisynthèse. Elles sont préparées par une réaction d'estérification entre le jaeschkenadiol et différents acides.

III.1 Analogues de la férutinine

Nous avons synthétisé d'abord une série d'analogues de la férutinine mono ou di-substitués. Ensuite, dans l'optique d'augmenter la taille de la molécule pour occuper la poche C du site de liaison, nous avons augmenté le nombre de carbone (deux carbones) après la liaison ester (bras). Ces deux carbones supplémentaires sont reliés soit par une liaison saturée soit par une liaison insaturée (Figure 45). D'autre part, nous avons aussi fait varier les substituants sur le noyau benzénique. Ainsi, la fonction hydroxyle est ou non présente, soit libre, soit dérivatisée. De même, le fluor plus électronégatif que l'hydroxyle a été introduit.

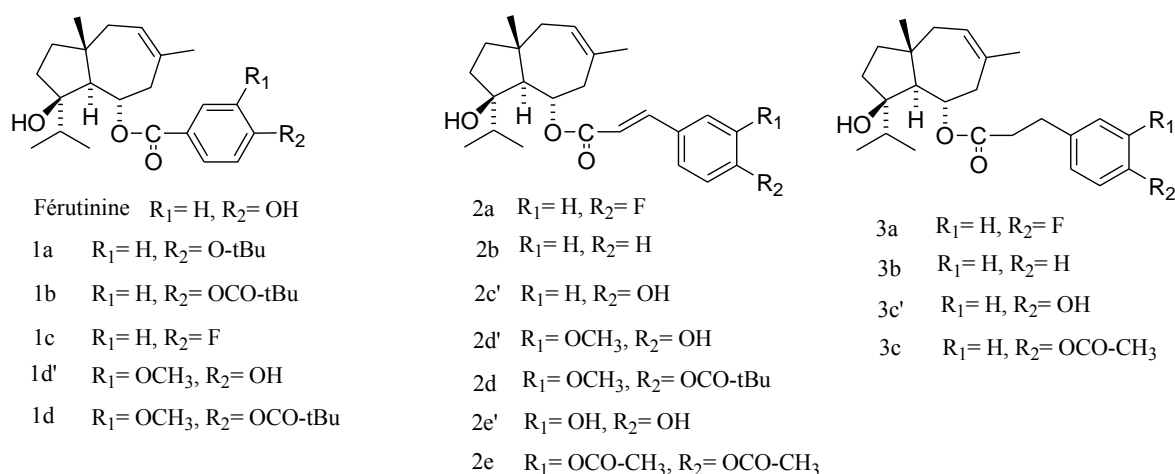


Figure 45 : Les analogues de la férutinine synthétisés.

Les acides phénoliques sont divisés majoritairement en acides hydroxybenzoïques et acides hydroxycinnamiques. Il existe une dizaine de molécules dérivées de ces acides, nous en avons choisi quelques-unes pour les utiliser dans des réactions d'estérification. La liste des acides choisis est représentée dans la Figure 46 ci-dessous.

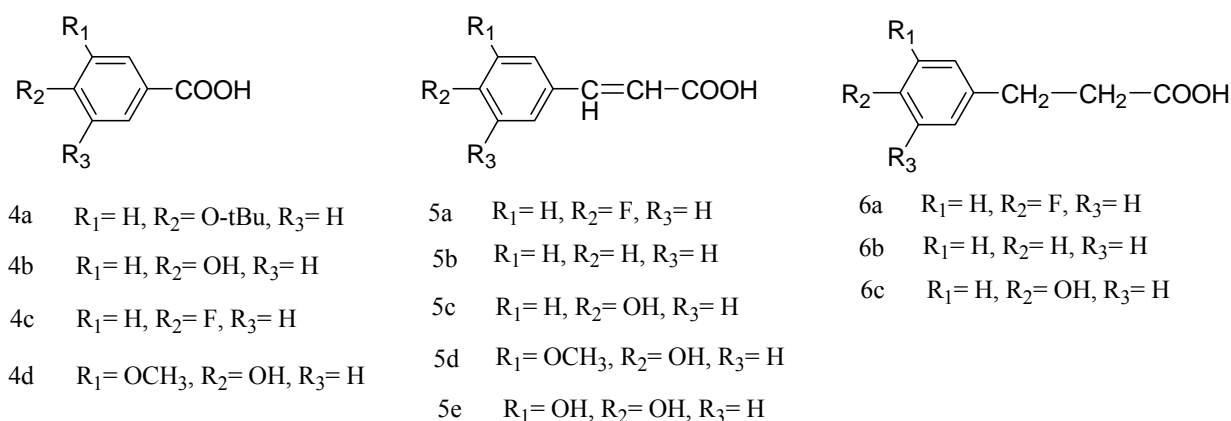


Figure 46 : Les acides phénoliques utilisés dans les réactions de synthèse.

D'une façon générale, les acides choisis pour les réactions d'estérification correspondent à des dérivés des acides phénoliques, trouvés naturellement en faibles quantités dans les plantes. Ces acides sont des métabolites secondaires dotés de propriétés antioxydantes et capables de prévenir l'apparition de plusieurs maladies (cancers, maladies cardiovasculaires et maladies liées au vieillissement) en neutralisant les radicaux libres de l'organisme (Owen RW *et al.*, 2000).

Le couplage des acides phénoliques avec d'autres molécules anticancéreuses a été déjà décrit. En combinant les acides, qui appartiennent à la classe des phyto-œstrogènes phénoliques avec le jaeschkenadiol, qui est un phyto-œstrogène non phénolique, on élargira peut être le champ d'activités biologiques des molécules résultantes (Figure 47).

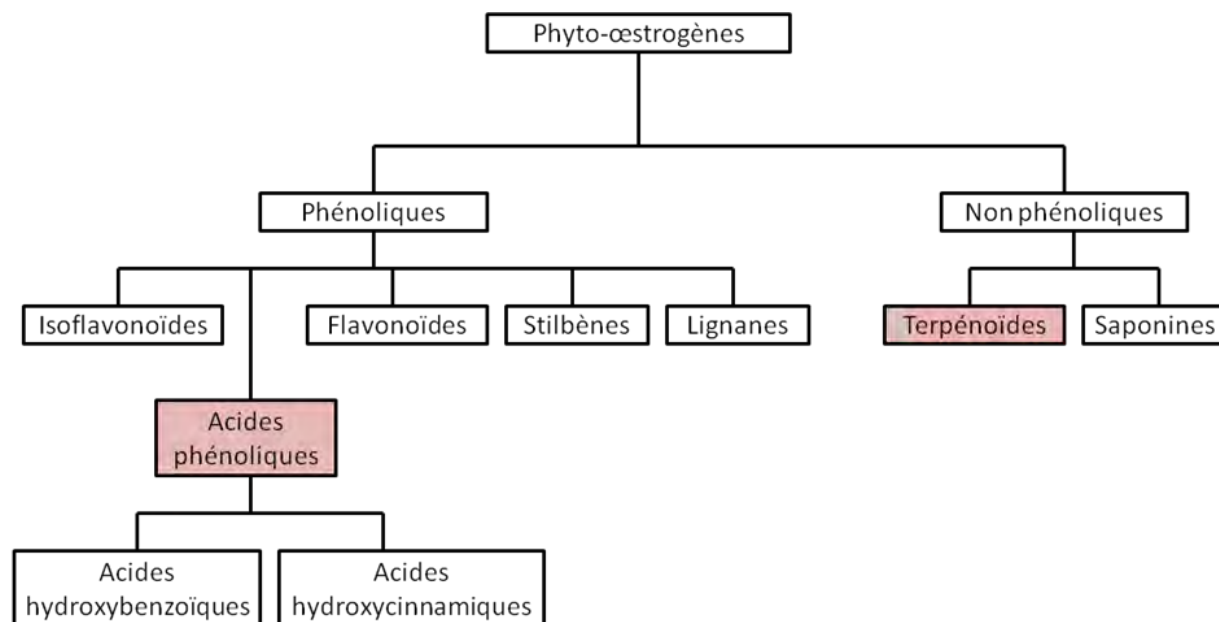


Figure 47 : Classification des phyto- œstrogènes. En rose, les classes choisies pour la synthèse (Liu RH, 2004).

III.2 Synthèse chimique

Pour accéder à la férutinine (également nécessaire en tant que référence pour les évaluations biologiques) et à ses analogues, nous avons réalisé des hémisynthèses à partir de la molécule naturelle de jaeschkenadiol, directement extraite à partir de *Ferula hermonis*. En effet, la disponibilité de la plante au Liban ainsi que la complexité de la synthèse du motif daucane de la molécule (plusieurs centres asymétriques) ont justifié notre orientation vers des réactions d'hémisynthèses.

III.2.1 Optimisation de la production de férutinine

L'optimisation de la production de férutinine est envisagée en vue d'augmenter le rendement en ce composé (52 %) décrit auparavant par Diab Y *et al.*, obtenu à partir d'une purification d'huile brute de la plante, par HPLC.. Pour cela, nous sommes partis du brevet déposé en 2008 (Bombardelli *et al.*, 2008) décrivant l'utilisation de la férutinine en cosmétique, notamment son incorporation dans des crèmes efficaces contre les rides.

III.2.1.1 Extraction des daucanes esters à partir de *Ferula hermonis*

L'huile brute de *Ferula hermonis* est obtenue par extraction à partir des racines ou des parties aériennes (feuilles) de la plante. Toutefois, les racines sont plus riches en férutinine et en d'autres esters benzoïques de jaeschkenadiol. Dans la suite du travail, les daucanes esters ont donc été extraits à partir des racines de la plante. Ces dernières sont d'abord broyées en poudre puis extraites par le dichlorométhane avec un appareil de Soxhlet. La concentration de l'extrait obtenu sous pression réduite donne une huile visqueuse riche en esters de daucanes (rendement 27 %) qui sont représentés dans la Figure 48.

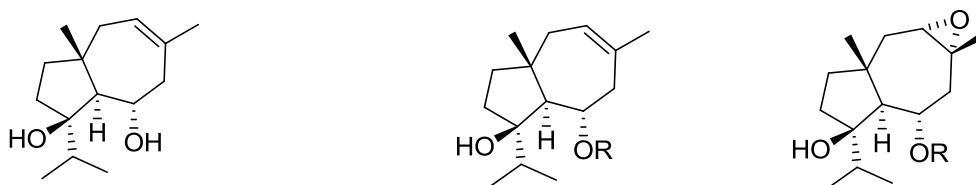
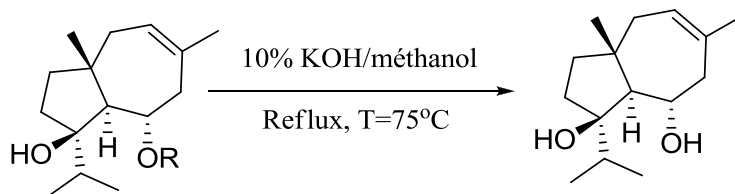


Figure 48 : Jaeschkenadiol et esters de daucane abondants dans l'huile de *Ferula hermonis*. Le substituant R correspond à un résidu aliphatique de type acyle linéaire ou branché, saturé ou insaturé, ou à un résidu aromatique éventuellement substitué.

III.2.1.2 Isolement du jaeschkenadiol

Suite à la récupération de l'huile brute, le protocole consiste à transformer par hydrolyse basique tous les esters de daucane contenus dans cette huile en jaeschkenadiol.

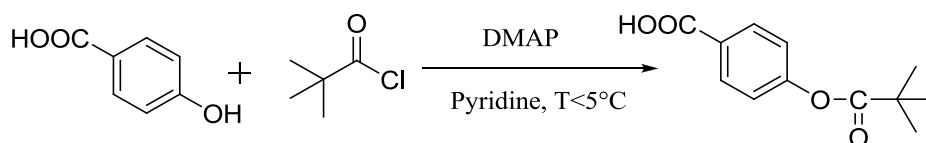


Après purification, par chromatographie liquide 'flash', ce jaeschkenadiol est obtenu sous forme cristalline. Le bilan de ce processus se traduit par l'obtention de 417 mg de jaeschkenadiol à partir d'1 g d'huile brute.

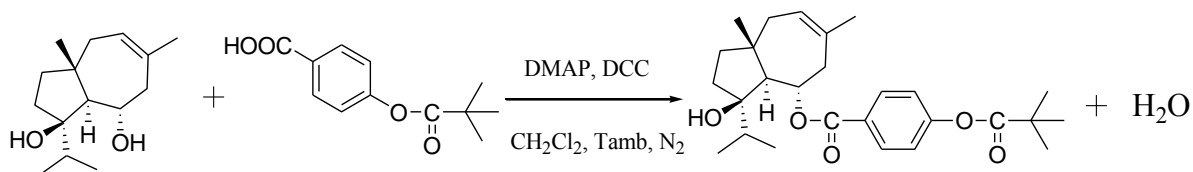
III.2.1.3 Esterification du jaeschkenadiol avec l'acide *p*-hydroxybenzoïque

Avant de coupler le jaeschkenadiol avec l'acide *p*-hydroxybenzoïque par une réaction d'estérification, la fonction hydroxyle libre de ce dernier est préalablement protégée afin d'éviter les réactions parasites (notamment les trans-estérifications qui peuvent avoir lieu entre les fonctions acides et alcools des deux entités). Nous avons choisi de protéger le OH phénolique sous forme de pivaloate.

La réaction est réalisée par action du chlorure de pivaloyl sur l'acide *p*-hydroxybenzoïque dans la pyridine à une température inférieure à 5 °C, en présence du diméthylaminopyridine (DMAP).



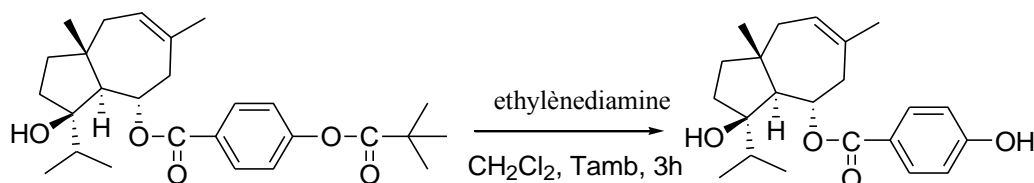
Après la mise en place de la protection de la fonction hydroxyle de l'acide, son addition sur le jaeschkenadiol a été réalisée en présence de DMAP et d'un activateur d'acide, le dicyclocarbodiimide (DCC) suivant la réaction :



L'utilisation du solvant anhydre ainsi que la manipulation sous atmosphère inerte (sous N₂) nous a permis d'optimiser le rendement à 98 %.

III.2.1.4 Clivage du groupement protecteur

L'ester formé, la « *p*-pivaloylférutinine » est ensuite hydrolysé en présence d'une base (éthylènediamine) pour aboutir à la férutinine avec un rendement quantitatif.



Ainsi, en partant d'1 g d'huile brute 417 mg de jaeshckenadiol pur a été obtenu par hydrolyse basique. Les étapes suivantes sont menées sur 50 mg de jaeshckenadiol pur pour obtenir 75 mg de férutinine. Le rendement global est de 61 %. Nous avons pu ainsi améliorer de près de 10 % la production de férutinine par rapport à 52 %, rendement obtenu en 2001 par notre laboratoire.

III.2.2 Synthèse de la série d'analogues de la férutinine

Les différents analogues (Figure 49) sont obtenus par des réactions d'estérification du jaeschkenadiol avec les différents acides choisis. Deux cas sont alors rencontrés. D'une part, si l'acide possède un groupement hydroxyle libre, une étape de protection de cette fonction est préalablement nécessaire. La réaction d'estérification se déroule alors en deux étapes : l'estérification avec l'acide protégé suivie d'une déprotection de l'ester protégé. D'autre part, si l'acide ne possède aucune fonction hydroxyle, la réaction d'estérification se déroule en une simple étape.

Ce schéma d'accès aux composés analogues de la férutinine est commun pour tous les produits synthétisés.

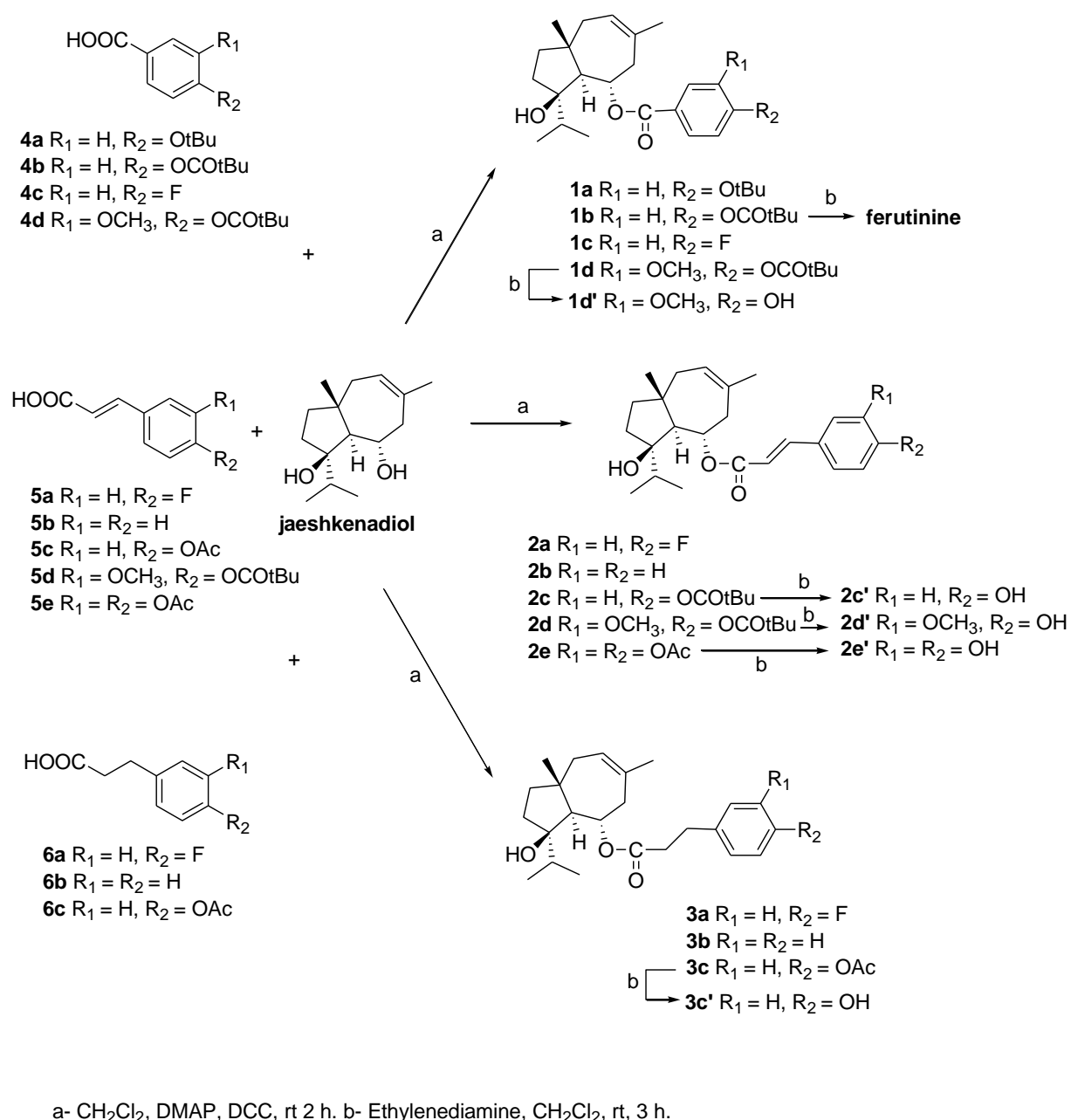


Figure 49 : Schéma réactionnel des analogues de la férutinine.

Le couplage du jaeschkenadiol avec les acides est effectué de la manière suivante :



Le groupement protecteur utilisé pour protéger les acides : **4a**, **4b**, **4d**, **5c** et **5d** est le pivaloyl. Dans le cas des acides **5e** et **6c** plusieurs essais ont été menés pour choisir le groupement protecteur, le *tert*-butyle n'étant pas un groupement efficace dans ces cas-là. Ainsi, pour ces acides, seule la protection sous forme d'acétate s'est avérée efficace.

La Figure 50 représente un exemple de protection de l'acide **5e** sous forme de di-acétate.

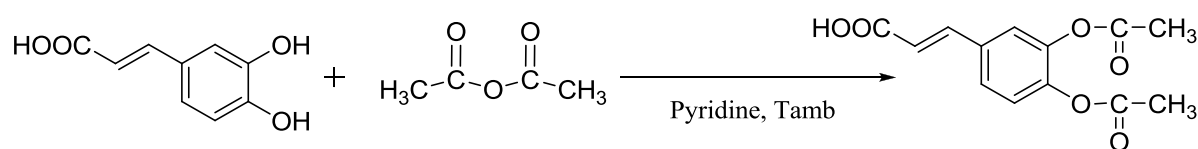


Figure 50 : Exemple de protection : synthèse de l'acide (E)-3-(3,4-diacetoxyphenyl) acrylique $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_4$.

Les rendements des analogues obtenus par les réactions d'estérification sont représentés dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Rendements pour les composés de la ligandothèque.

Composés	Rendement
<i>Férutinine</i>	61 %
<i>1a</i>	35 %
<i>1b</i>	98 %
<i>1c</i>	65 %
<i>1d'</i>	60 %
<i>1d</i>	58 %
<i>2a</i>	55 %
<i>2b</i>	66 %
<i>2c'</i>	37 %
<i>2d'</i>	71 %
<i>2d</i>	62 %
<i>3a</i>	73 %
<i>3b</i>	96 %
<i>3c'</i>	67 %
<i>3c</i>	72 %
<i>2e'</i>	27 %
<i>2e</i>	36 %

Ces rendements varient de 27 % à 98 %, mais n'ont pas été optimisés, l'objectif final étant d'avoir une quantité suffisante des produits pour réaliser les tests biologiques *in vitro*.

III.3 Application du filtre *in silico* aux analogues de la férutinine

Le filtre de calcul *i)* validé par la reproduction de la cristallographie des ligands des structures canoniques puis *ii)* testé sur la férutinine, a confirmé les résultats biologiques de la molécule dans sa réactivité vis-à-vis des REs. De plus, il a orienté les synthèses vers des molécules antagonistes des récepteurs. Ce filtre potentiellement intéressant est ensuite appliqué aux analogues de la férutinine. Ainsi, parallèlement à leur synthèse, ces analogues (**1a-3c**, **1d'**, **2c'-2e'** et **3c'**) ont été engagés dans diverses expériences d'arrimage moléculaire.

Les résultats qui ressortent de ces calculs sont résumés dans les items suivant :

- Quels que soient les paramètres de calculs imposés, à savoir la définition du site de liaison et la définition des zones protéiques flexibles, la pose la plus favorable en terme

de score d'arrimage (docking score) correspond généralement à celle où la partie phényle de l'analogue se superpose avec la même partie des ligands du complexe réel ligand-récepteur.

- L'encombrement stérique au niveau de la substitution du benzène défavorise l'arrimage des molécules dans le site de liaison (dans le cas du récepteur RE β , ce type de molécules sort du site).
- La suppression de la liaison hydrogène par la substitution du groupement hydroxyle perturbe l'interaction des molécules avec les acides aminés du site de liaison.
- Les composés sélectionnés comme candidats antagonistes sont ceux qui s'arriment dans des structures protéiques antagonistes ou dans un site large (cas des molécules intermédiaires), même s'ils peuvent s'arrimer aussi bien dans un site agoniste.
- Le site du récepteur RE β est plutôt limité aux petites molécules (molécules compactes).

Nous représentons à la suite l'ensemble des calculs correspondant aux molécules candidates de la ligandothèque, dans chaque type de récepteur (RE α et RE β).

III.3.1 Méthodologie d'analyse

Dans un premier temps nous allons préciser les termes et la méthodologie d'analyse. Pour chaque composé, 10 calculs d'arrimage indépendants sont réalisés, les conditions de calcul sont identiques à celles du chapitre précédent : templates (profil pharmacophorique), flexibilité des résidus du site de liaison et du ligand, calcul GPU, fonction de score MolDock (MolDock [GRID]) simplifiée pendant le calcul, complète après l'arrimage et une minimisation terminale. Pour chacun de ces jeux de 10 essais, le meilleur score MolDock et le meilleur score Rerank sont extraits indépendamment et reportés dans les colonnes correspondantes.

La meilleure pose²⁵ MolDock de chaque jeu est ensuite examinée. Le descripteur *CBP* positionné à + indiquera que la pose est conforme. En d'autres termes, la partie phénolique substituée (groupe R₂ de la Figure 45 ou de la Figure 49) du composé aura tendance à s'aligner sur la partie phénolique des ligands des REs, telle qu'elle apparaît dans les conformations cristallographiques.

²⁵ Le terme 'pose' correspond à une conformation/orientation d'un ligand qui est obtenue après un calcul d'arrimage. Chaque pose est donc affectée de valeurs de scores ou de contributions énergétiques spécifiques.

L'indicateur *CPC* compte le nombre de calculs d'arrimages indépendants conduisant à une pose conforme. Par exemple, sur 10 calculs une pose conforme a été obtenu correspondant au meilleur score MolDock, mais également d'autres poses ont été obtenues moins favorables en score mais conformes (la partie phénolique substituée aura tendance à s'aligner de la même manière sur la conformation de référence, mais les parties daucane pourront afficher des conformations différentes).

CBP et *CPC* doivent être considérés comme des indicateurs de stabilité ou de confiance concernant les calculs. Il arrive que dans certains cas, la meilleure pose en termes de score ne soit pas en interaction dans la zone attendue du site. Plus le ligand tendra à être petit dans le site (fragment) plus ce cas de figure tendra à se produire. D'ailleurs, pour que le ligand soit reconnu il faut que sa partie phénolique substituée soit alignée et orientée dans une zone particulière (conformité). L'obtention d'une pose 'forte' (les scores MolDock et Rerank sont les meilleurs scores pour la même pose) et d'une valeur de *CPC*= 9, renforcera l'idée que ce ligand s'arrime très bien dans la cavité.

III.3.2 Cas du récepteur RE α

Les composés analogues de la férutinine ont été arrimés dans le site de liaison du récepteur RE α . Les tableaux composites à la suite présentent les résultats de calculs d'arrimage dans le cas des 6 structures (1G50a, 1XPC_, 2IOG_, 2P15bR, 1R5KaR, 3ERT_) canoniques utilisées pour les calculs.

Dans le Tableau 21 concernant la structure 1G50a, les meilleurs scores sont ceux qui sont le plus négatifs, les cellules (MolDock, Rerank) sont colorées en fonction d'intervalles de -25 unités de score ($< -150 < -100 < -50 < 0$ pour les couleurs rouge foncé, rouge, orange et jaune).

Tableau 21 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 1G50a.

Structure	Ligand	MolDock	Rerank	CBP	CPC
1G50a	1a	-115,88	111,48	+	4
	1b	-60,79	388,11	+	7
	1c	-64,69	188,83	+	8
	3a	-67,87	97,86	+	4
	2a	-98,61	69,34	+	4
	3b	-107,82	60,08	-	0
	2b	-100,24	37,20	+	9
	3c'	-70,74	181,61	+	5
	3c	-110,00	65,60	-	1
	2c'	-100,44	151,31	+	10
	1d'	-65,33	316,06	+	10
	1d	-45,39	456,50	+	3
	2d'	-116,11	96,03	+	9
	2d	-113,84	163,97	-	0
	2e'	-120,90	33,96	+	8
	2e	-183,08	-84,77	-	0

D'après ce tableau, les scores MolDock sont intéressants, mais pas les scores Rerank (même s'il s'agit du meilleur score Rerank obtenu). En d'autres termes les deux systèmes de score ne convergent pas. Sauf dans le cas du composé **2e** ou nous avons deux valeurs de scores MolDock et Rerank correspondant aux meilleurs scores de la série des ligands. Sur la base d'une analyse exclusive des valeurs de score (par exemple un criblage *in silico*) ce composé devrait être considéré comme un bon candidat vis-à-vis de la structure 1G50a. Mais cette meilleure pose pour le composé **2e** n'est pas conforme (CBP= -, pour simplifier par rapport au chapitre précédent nous avons remplacé les notations Oui/Non de CBP par +/-).

Les bons scores obtenus s'expliquent par le fait que la pose s'ajuste bien à la cavité, mais de manière inversée par rapport à une position conforme, ce que montre la Figure 51 qui compare les conformations de poses issues de l'arrimage avec la conformation cristallographique de référence (identique dans plusieurs structures PDB) de l'œstradiol (jaune). Nous constatons que le phényle substitué de **2e** (image de gauche, violet) est à l'opposé de la position du phénol de référence de l'œstradiol.

A titre de comparaison, la férutinine (image de droite, vert) dans les mêmes conditions de calcul, exhibe une pose conforme malgré des scores MolDock et Rerank moins élevés²⁶.

²⁶ Scores avant normalisation par une métrique. Par exemple (cas le plus simple) la division des valeurs de scores par le nombre d'atome lourds (C, N, O) de chaque ligand.

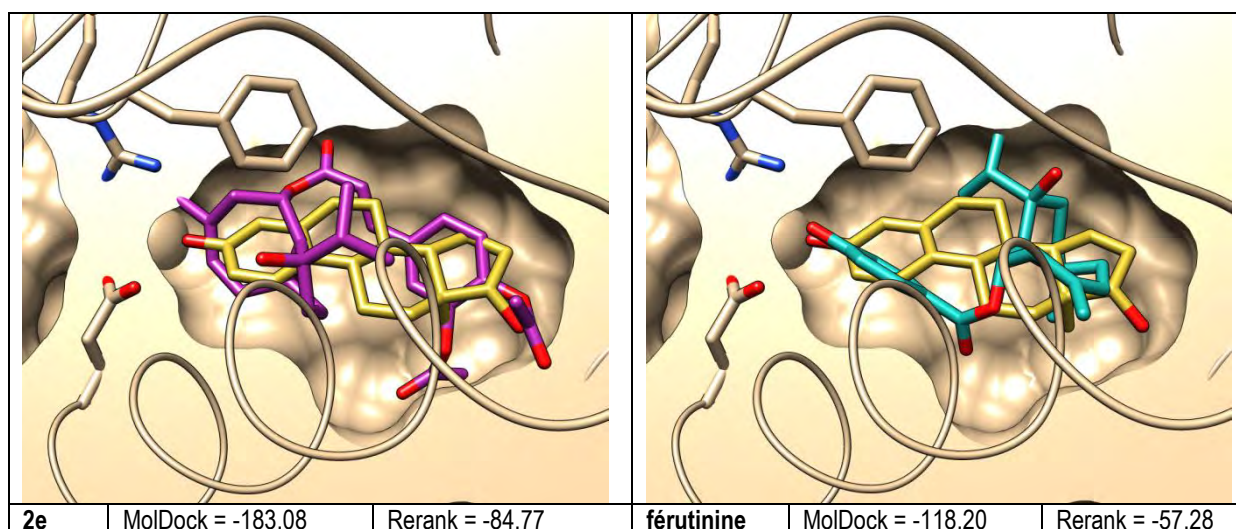


Figure 51 : Modes d'arrimage dans la structure 1G50a, incluant le ligand EST (œstradiol, jaune) co-cristallisé.

Concernant le composé **2e** la question est de savoir si cette pose particulière est significative. Le descripteur *CPC* est égal à zéro, aucune pose conforme n'a été obtenue avec ce composé. En fait, ce type de comportement (bons scores mais pose non conforme) se reproduit avec la seconde meilleure pose de la série. L'ensemble de ces éléments tend donc à faire penser que le composé **2e** n'est pas un bon candidat à l'arrimage conforme dans 1G50a.

Les cellules de la colonne *CPC* sont colorées en fonctions d'intervalles de 2 coups (10-9, 8-7, 6-5, 4-3 pour les couleurs rouge foncé, rouge, orange et jaune). Cette structure répond bien en termes de score MolDock/*CBP*/*CPC* à la collection moléculaire. Les produits **2b**, **2c'**, **2d'** se détachent avec, à la fois, des valeurs de *CPC* > 8 et des scores MolDock < -100. Les composés **1b**, **1c**, **3c'**, **1d'**, **2e'** sont intéressants avec des valeurs de score MolDock < -50 ou < -100 et des valeurs de *CPC* > 5. D'autres part dans cette série, lorsque la valeur de *CPC* est supérieure à 5, une valeur de *CBP* = + est généralement retrouvée.

A noter que d'autres contributions issues du calcul peuvent être prises en compte, et que des descripteurs dérivés autres que *CBP* et *CPC* peuvent être conçus. Mais cet exemple illustre la démarche qui a été appliquée dans l'analyse des résultats avec l'idée que les valeurs de scores ne sont probablement pas suffisantes pour modéliser la complexité biologique et sélectionner les molécules d'intérêt.

Les résultats pour les autres structures du récepteur (1XPC_, 2IOG_, 2P15bR, 1R5KaR, 3ERT_) avec le même code couleur sont donnés dans les Tableau 22, Tableau 23, Tableau 24, Tableau 25 et Tableau 26.

Tableau 22 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 1XPC_.

Structure	Ligands	Moldock	Rerank	CBP	CPC
1XPC_	1a	-48,33	279,40	-	0
	1b	-29,23	500,73	-	0
	1c	66,62	951,82	-	0
	3a	-107,86	2,00	-	0
	2a	10,99	566,42	-	0
	3b	-116,30	-66,38	-	1
	2b	-8,23	517,98	-	0
	3c'	-85,55	149,04	+	1
	3c	-99,96	76,13	-	0
	2c'	-79,73	97,78	-	0
	1d'	-132,28	-94,88	-	0
	1d	-92,76	228,01	-	0
	2d'	-79,598	255,78	-	0
	2d	0,21	711,50	-	0
	2e'	-41,59	231,52	-	0
	2e	-174,60	-101,47	-	0

Ce tableau confirme que les scores et les descripteurs *CBP*, *CPC* de la structure 1XPC_ ne sont pas intéressants en comparaison avec la structure précédente. Une fois de plus le composé **2e** est bon en termes de score mais n'arrime pas de manière conforme. Si nous devions retenir une molécule, le composé **3c'** serait sélectionnable.

Tableau 23 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 2IOG_.

Structure	Ligands	Moldock	Rerank	CBP	CPC
2IOG_	1a	-61,43	296,36	+	2
	1b	-53,11	332,94	-	0
	1c	134,92	1137,84	-	0
	3a	15,18	674,57	+	2
	2a	-35,51	417,93	+	2
	3b	222,21	1892,29	-	0
	2b	-15,05	309,66	+	1
	3c'	-112,19	-29,02	+	9
	3c	-41,25	470,99	+	4
	2c'	-35,26	327,70	+	8
	1d'	-28,89	489,63	+	7
	1d	-73,74	304,67	+	2
	2d'	-55,49	388,64	+	9
	2d	-12,69	274,08	+	2
	2e'	-29,54	243,27	+	7
	2e	-190,22	-115,16	-	0

Ce tableau montre que le composés **3c'** doit être retenu et dans une moindre mesure les composés **2c'**, **1d'**, **2d'** et **2e'**. Une fois de plus le composé **2e** n'arrime pas de manière conforme.

L'obtention des poses systématiquement non conformes avec un composé tel que **2e** n'est pas avantageux à la sélection, mais ces informations restent intéressantes, dans une optique de

développements futurs. Par exemple²⁷, si toutes les poses correspondantes sont superposables ou en tout cas conservent des invariants en termes de conformation ou de d'orientation, ces informations peuvent donner de nouvelles idées de conception-synthèse, sur base daucane ou en utilisant un autre cœur moléculaire.

Tableau 24 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 2P15bR.

Structure	Ligands	Moldock	Rerank	CBP	CPC
2P15bR	1a	-139,04	-90,98	+	5
	1b	-97,40	103,96	+	4
	1c	-92,59	-55,82	+	7
	3a	-101,60	-32,17	+	7
	2a	-7,18	506,42	+	1
	3b	-1,47	666,90	+	4
	2b	-75,30	144,57	+	2
	3c'	-130,82	-86,00	+	8
	3c	-90,40	91,17	+	2
	2c'	-138,21	-97,34	+	8
	1d'	-93,31	208,64	+	6
	1d	-99,00	218,27	+	2
	2d'	-109,75	133,45	+	6
	2d	-121,07	95,88	-	0
	2e'	-113,01	65,38	+	7
	2e	-114,20	44,63	+	2

Tableau 25 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 1R5KaR.

Structure	Ligands	Moldock	Rerank	CBP	CPC
1R5KaR	1a	111,29	1205,41	-	0
	1b	176,77	1592,66	-	0
	1c	-98,68	-66,90	+	3
	3a	114,56	1122,60	-	0
	2a	-82,77	87,10	+	1
	3b	-101,38	-51,29	-	0
	2b	136,34	1124,17	-	0
	3c'	-120,67	-45,88	+	5
	3c	-18,66	463,12	-	0
	2c'	-88,18	131,30	+	7
	1d'	-68,36	246,86	+	6
	1d	-15,32	528,22	-	0
	2d'	167,56	1450,44	-	0
	2d	14,39	761,37	-	0
	2e'	28,03	669,68	-	0
	2e	-101,82	-124,14	-	0

²⁷ Le même type de remarque, assez générique en fait, se retrouvera plus loin avec d'autres composés, par exemple le dérivé **2d'** dans le cas des structures REβ.

Tableau 26 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 3ERT₋.

Structure	Ligands	Moldock	Rerank	CBP	CPC
3ERT ₋	1a	73,13	1116,34	-	0
	1b	13,49	795,20	-	0
	1c	1,37	495,02	-	0
	3a	41,41	923,58	-	0
	2a	19,61	521,82	-	0
	3b	42,81	456,42	-	0
	2b	-88,28	170,79	-	0
	3c'	-50,23	342,43	-	0
	3c	53,34	661,56	-	0
	2c'	39,77	812,88	-	0
	1d'	-59,34	344,88	-	0
	1d	-80,07	300,90	-	0
	2d'	-18,81	484,52	-	0
	2d	-66,83	291,43	-	0
	2e'	113,18	1166,09	-	0
	2e	-130,10	-82,29	-	0

Les trois tableaux précédentes montrent que :

- La structure 2P15bR affiche une bonne réponse vis-à-vis des composés **3c'**, **2c'** et dans une moindre mesure de **1a**, **1c**, **3a**, **1d'**, **2d'** et **2e'**.
- La structure 1R5KaR montre une bonne réponse vis-à-vis des composés **2c'**, **3c'** et dans une moindre mesure de **1d'** et **1c**.
- La structure 3ERT₋ ne montre pas de réponse vis-à-vis de la collection de composés.

III.3.2.1 Consolidation et interprétation

Si l'ensemble des interprétations précédentes²⁸ est consolidé, nous obtenons le Tableau 27 avec deux ++ pour les composés qui répondent nettement et un seul + pour les composés qui répondent moins bien en termes de scores et de descripteurs, mais qui correspondent à un signal. On constate alors que les composés **3c'**, **2c'**, éventuellement **2d'** sont les plus intéressants de cette collection moléculaire.

²⁸ Au final, la sélection de la meilleure pose repose essentiellement sur le choix des meilleures valeurs des descripteurs CBP et CPC qui traduisent, associés au score MolDock, une notion de meilleur score conforme. Les scores Rerank sont plus difficiles à interpréter sur cette série de composés que les scores MolDock, il s'en suit la priorité MolDock > Rerank dans la prise en compte des valeurs de scores.

Tableau 27 : Résultats d'arrimage des analogues sélectionnés de la férutinine dans le récepteur RE α .

Ligands	1G50a	2P15bR	2IOG ₋	3ERT ₋	1XPC ₋	1R5KaR
1a		+				
1b	+					
1c	+	+				+
3a		+				
2a						
3b						
2b	++					
3c'	+	++	++		+	++
3c						
2c'	++	++	+			++
1d'	+	+	+			+
1d						
2d'	++	+	+			
2d						
2e'	+	+	+			
2e						

Dans le cas du cancer du sein, les molécules antagonistes du RE α empêchent la transcription des gènes de survie cellulaire et par conséquent, inhibent la prolifération des cellules cancéreuses. Dans le cas du RE α , les protéines 'antagonistes' (où l'hélice H12 est repoussée vers l'extérieur) correspondent à 2IOG₋, 3ERT₋, 1XPC₋ et 1R5KaR.

Ainsi, si notre molécule est capable de s'arrimer dans ce type de structures, elle pourrait être un composé candidat antagoniste et vice versa pour les protéines 'agonistes' 1G50a et 2P15bR. Le docking de la liste des molécules hypothétiques dans le RE α nous a donc permis de sélectionner trois composés **3c'**, **2c'** et **2d'** candidats qui répondent potentiellement à des sites agonistes et antagonistes.

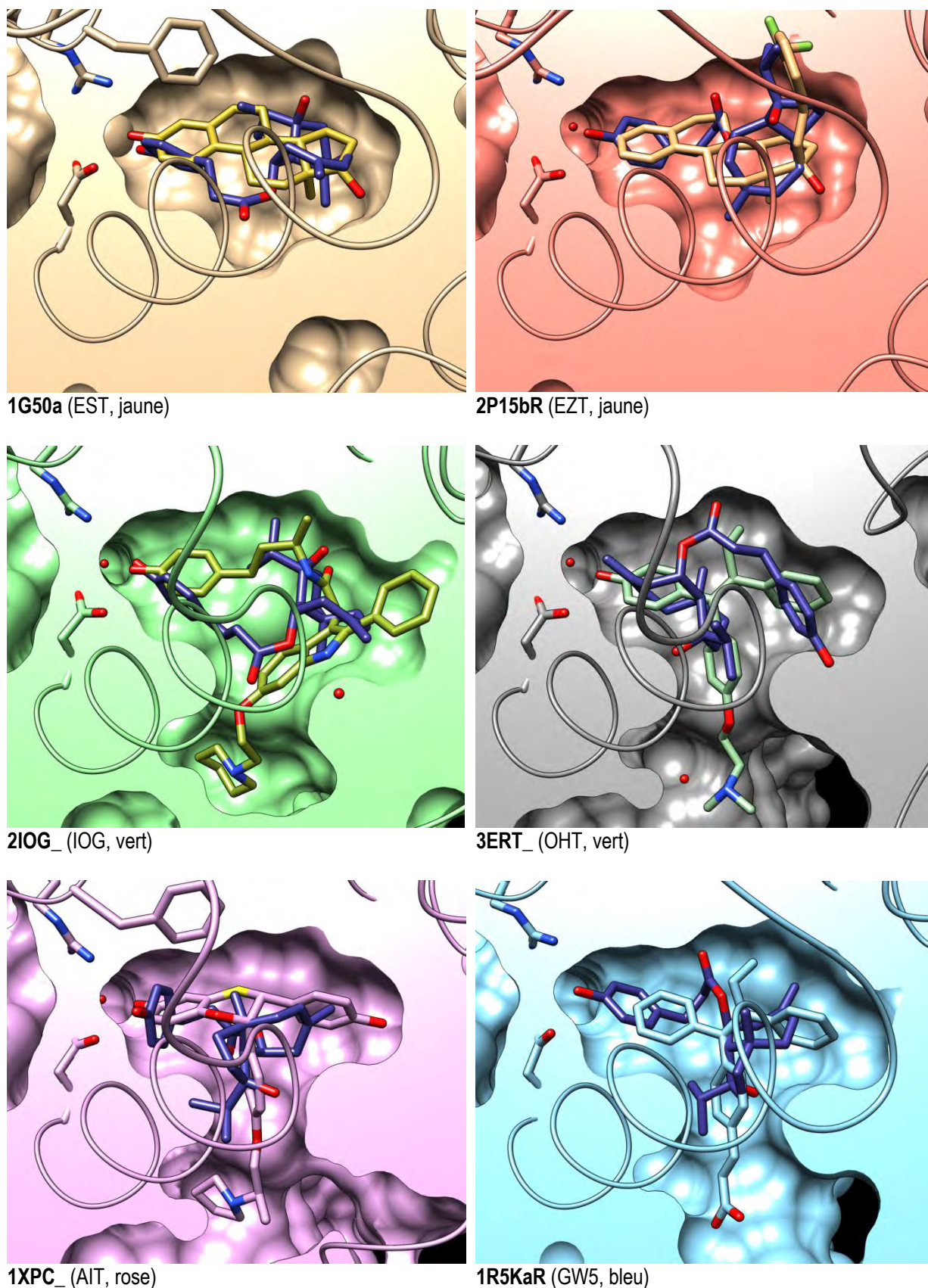


Figure 52 : Représentation visuelle des poses de **3c'** (violet) dans les 6 sites canoniques, incluant les ligands co-cristallisés correspondants (EST, EZT, IOG, OHT, AIT, GW5). Les résidus Glu 353, Arg 394 et Phe 404 sont représentés, chaque structure est orientée de manière identique et les plans de coupes sont superposables.

La Figure 52 précédente, montre les poses de **3c'** issues des tables précédentes dans chaque structure canonique en les superposant par rapport au ligand co-cristallisé de chaque structure, et dans la même orientation et plan de coupe de la structure. Ce composé (il en est de même pour **2c'** et **2d'**) tend à occuper visuellement la poche C, comme l'agoniste ou l'antagoniste correspondant de chaque protéine. Sauf dans le cas de la structure 3ERT_ où la pose n'est pas conforme, le groupe phénol de **3c'** est à l'opposé (à droite de la cavité) du passage formé par les résidus Glu 353 et Arg 394 (à gauche de la cavité).

A ce niveau, il est encore difficile d'orienter les composés vers un comportement agoniste ou antagoniste en fonction des résultats d'arrimage. Pour aller plus loin dans cette démarche, des calculs complémentaires doivent être réalisés. En effet, les calculs en mode flexible (flexibilité des résidus du site de liaison et du «backbone») ont tendance, dans une certaine mesure, à moyenniser les résultats. Il faudra donc avoir : *i)* soit un autre paramétrage de la flexibilité ; *ii)* soit une autre méthode qui prenne en compte la flexibilité conformationnelle du récepteur d'une manière plus continue que les 6 états (structures canoniques) utilisés.

III.3.3 Cas du récepteur REβ

Les composés analogues de la férutinine ont été arrimés dans le site de liaison du récepteur REβ. Les tableaux (Tableau 28, Tableau 29, Tableau 30, Tableau 31 et Tableau 32) composites à la suite représentent les résultats des calculs d'arrimage et utilisent les mêmes conventions que dans le cas des REα.

Tableau 28 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 1QKN_.

Structure	Ligands	Moldock	Rerank	CBP	CPC
1QKN_	1a	51,50	637,35	-	0
	1b	-57,69	24,74	-	0
	1c	99,12	1017,24	+	3
	3a	-45,01	314,73	+	3
	2a	84,47	943,25	+	1
	3b	19,10	669,88	+	2
	2b	-107,49	65,38	+	1
	3c'	-64,03	323,45	+	3
	3c	21,26	707,85	-	0
	2c'	-6,48	548,95	-	0
	1d'	17,51	420,65	-	0
	1d	-1,22	473,33	-	0
	2d'	13,42	736,22	-	0
	2d	62,93	1053,27	-	0
	2e'	55,36	981,54	-	0
	2e	22,36	956,33	-	0

Cette structure répond peu à la collection de ligands. Les composés **3a**, **2b** et **3c'** pourraient, à la limite, être retenus.

Tableau 29 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 1U3Sa.

Structure	Ligands	Moldock	Rerank	CBP	CPC
1U3Sa	1a	240,69	1765,52	-	0
	1b	-132,26	50,99	+	2
	1c	357,44	2451,53	-	0
	3a	-162,43	-119,20	+	8
	2a	479,55	3197,98	-	0
	3b	48,703	1061,67	+	3
	2b	-115,94	40,50	+	8
	3c'	-123,36	30,89	+	6
	3c	-152,67	-67,82	-	0
	2c'	-116,24	47,48	+	7
	1d'	-68,28	149,78	+	5
	1d	-134,18	101,03	-	0
	2d'	-131,94	61,55	+	9
	2d	-165,98	-25,59	-	0
	2e'	-119,27	45,26	+	4
	2e	-59,20	603,45	-	0

Les composés **3c** et **2d** de scores élevés (MolDock, Rerank) ne permettent pas d'obtenir des poses conformes. La Figure 53 montre les deux poses correspondantes de **3c** (bleu) et de **2d** (jaune) dans la structure 1U3Sa, comparées avec le composé (797, violet) qui co-cristallise avec le récepteur ER β dans la même structure.

Le composé **3c** (Figure 53, gauche) est présent dans la cavité d'intérêt, mais il est mal orienté, le phénol substitué étant dirigé du côté opposé (droite) à celui qui est marqué par les résidus Glu 305, Arg 346 et Phe 356. Le composé **2d** est, quant à lui, arrimé dans la cavité voisine, à gauche des résidus Glu 305 et Arg 346.

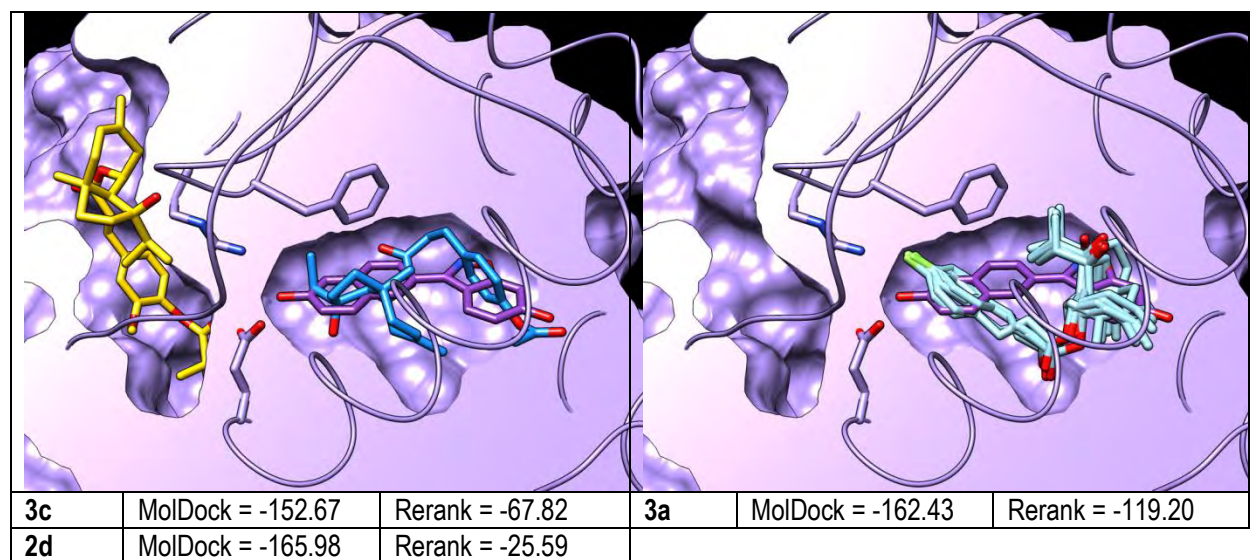


Figure 53 : Modes d'arrimage dans la structure U3Sa, incluant le ligand 797 (violet) co-cristallisé.

Par contre, le composé **3a** (Figure 53, droite, 5 premières poses MolDock) montre une occupation conforme de la cavité et de manière conforme, même si l'analogie entre un

phényle substitué par un atome de Fluor et un phénol substitué est avant tout une hypothèse de travail qui doit être confirmée par des résultats *in vitro*.

Dans une moindre mesure **2b**, **3c'**, **2c'** et **2d'** et **1d'** peuvent être retenus en plus du dérivé **3a** pour la structure 1U3Sa.

Tableau 30 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 1X7R_.

Structure	Ligands	Moldock	Rerank	CBP	CPC
1X7R_	1a	-65,20	449,18	+	2
	1b	-37,56	184,78	-	0
	1c	-40,60	334,06	+	4
	3a	-104,38	105,85	+	5
	2a	-133,20	-31,59	+	6
	3b	-123,38	-39,49	+	7
	2b	-120,64	19,94	+	8
	3c'	-150,37	-103,52	+	10
	3c	-123,18	-6,51	-	0
	2c'	-128,92	-38,27	+	10
	1d'	-130,21	-33,03	+	8
	1d	-78,45	252,11	-	0
	2d'	-59,73	421,97	+	1
	2d	54,64	1197,39	-	0
	2e'	-151,85	-109,03	+	8
	2 ^e	-123,38	42,60	-	0

Dans le cas de 1X7R_, les signaux correspondant aux composés **3c'** et **2e'** sont extrêmement forts, il est possible de retenir également **2c'**, **1d'** et dans une moindre mesure : **2a**, **3b**, **2b**, voire **1c** et **3a**.

Les meilleures poses des composés **3c'** et **2e'** affichent des conformations après arrimage dans 1X7R_ qui sont proches de celles du dérivé **3a** (figure précédente) dans la structure 1U3Sa, les deux cavités correspondant à des sites fermés.

Tableau 31 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 2IOJc.

Structure	Ligands	Moldock	Rerank	CBP	CPC
2IOJc	1a	-26,52	577,00	-	0
	1b	-81,59	4,24	-	0
	1c	-80,61	65,24	+	8
	3a	-104,05	-62,15	-	0
	2a	24,19	622,41	-	0
	3b	-50,60	345,77	-	0
	2b	-25,03	397,69	-	0
	3c'	-130,17	-63,94	+	8
	3c	-47,30	155,51	-	0
	2c'	-116,69	-33,54	+	3
	1d'	-118,01	39,36	+	9
	1d	132,77	1199,26	-	0
	2d'	-125,36	-44,73	-	0*
	2d	-75,81	92,42	-	0
	2e'	42,39	809,23	-	0
	2 ^e	-62,26	268,99	-	0

La structure 2I0Jc réponds moins bien que la précédente, mais les composés **3c'**, **1d'** et dans une moindre mesure les composés **1c** et **2c'** pourront être retenus.

Les deux composés **3c'**, **1d'** ainsi que **2c'** et **1c** s'arriment dans le site large de 2I0Jc (en remplissant la surface complète de ce site contrairement à son ligand agoniste, I0G) avec des scores Moldock élevés et une position conforme du cycle phényle dans le plan horizontal du site. Le cas du composé **2d'** est intéressant, les scores sont bons mais **2d'** s'arrime de manière non conforme et avec des modalités totalement différentes de celles des dérivés **3c** et **2d** dans la structure 1U3Sa (cas précédent).

La Figure 54 montre les modes d'arrimages différents pour **3c'** et **1d'** (conformes) et **2d'** non conforme et aligné dans le plan vertical, dans le cas de 2I0Jc et de son ligand (I0G, rose) co-cristallisé.

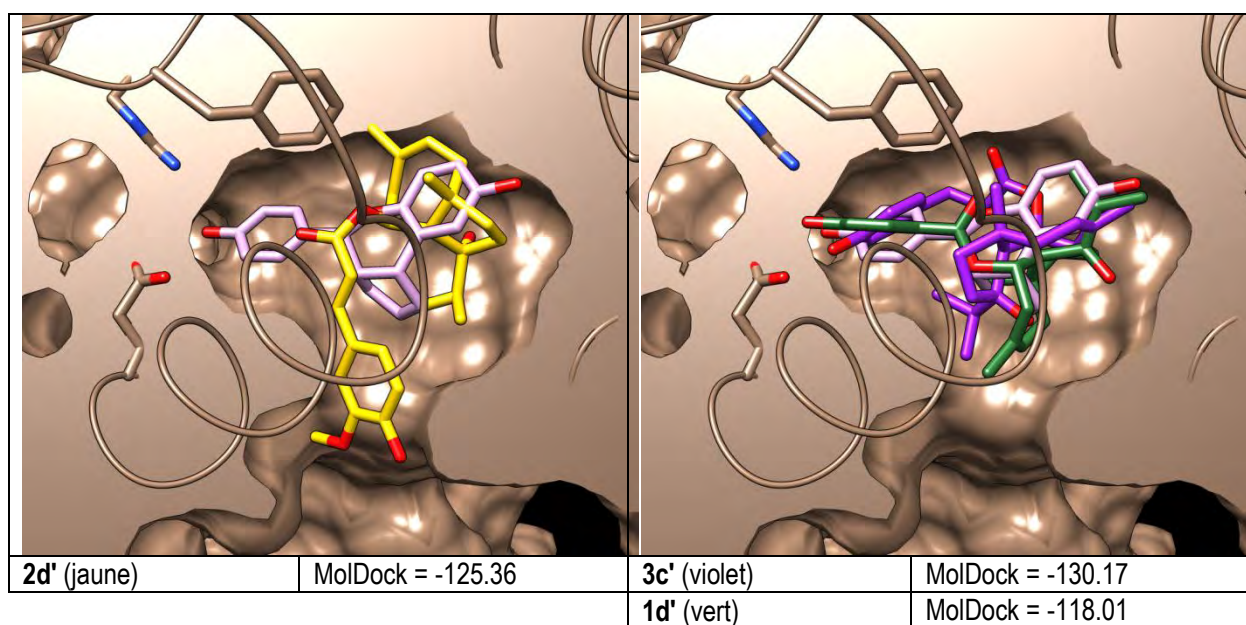


Figure 54 : Modes d'arrimage dans la structure 2I0Jc, incluant le ligand I0G (rose) co-cristallisé.

Tableau 32 : Résultats d'arrimage des analogues de la FRT dans le site de la structure protéique 2YJA_.

Structure	Ligands	Moldock	Rerank	CBP	CPC
2YJA_	1a	-122,30	271,36	-	0
	1b	-118,76	148,09	-	0
	1c	-84,39	235,18	+	8
	3a	-108,79	76,23	+	6
	2a	-100,72	155,95	-	1
	3b	-110,82	32,70	+	7
	2b	-104,18	76,10	+	3
	3c'	-96,05	108,85	+	8
	3c	-74,46	114,66	-	0
	2c'	-119,29	-27,54	+	8
	1d'	-64,25	412,86	+	9
	1d	-107,04	34,87	-	0

	2d'	-121,43	-10,49	+	5
	2d	-105,65	148,91	-	0
	2e'	-34,73	539,05	+	3
	2e	-67,75	1376,12	-	0

* : Cas intéressant, 10 poses dans la poche C du site

Les résultats dans la structure 2YJA_ sont un peu plus bruités, il est possible de retenir le composé **2c'** et **2d'**, dans une moindre mesure **1d'**, **3c'**, **3b**, **1c** et **3a**.

III.3.3.1 Consolidation et interpretation

Le Tableau 33 suivant résume les résultats précédents dans les sites protéiques à tendance antagonistes-agonistes, après consolidation des interprétations.

Tableau 33 : Résultats d'arrimage des analogues de la férutinine dans le cas du récepteur REβ.

Ligands	1QKN_	1X7R_	1U3Sa	2YJA_	210Jc
1a					
1b					
1c		+		+	+
3a	+	+	++	+	
2a		+			
3b	+	+		+	
2b		+	+		
3c'	+	+++	+	+	++
3c					
2c'		++	+	++	+
1d'		++	+	+	++
1d					
2d'			+	++	
2d					
2e'		++			
2e					

Les composés **3a**, **3c'**, **2c'** et **1d'** ressortent de ce tableau et dans une moindre mesure **1c**, **3b**, **2b** et **2d'**.

Il est intéressant de constater que les composés **3c'** et **2c'** (avec **2d'**) étaient également les composés retenus dans le cas des REα. A ce niveau il est encore difficile de prédire une quelconque spécificité ou un ordre d'affinité, des résultats *in vitro* devraient permettre de lever cette ambiguïté et de progresser dans le paramétrage de ce filtre post-arrimage.

Dans la problématique du cancer du sein, le rôle du récepteur REβ dans la prolifération des cellules cancéreuses est parfois contradictoire. Par exemple, la plupart des citations issues de la littérature, témoignent que la surexpression de ce type de récepteur est un bon pronostic pour le cancer. Dans notre étude, nous avons choisi les molécules qui s'arriment dans des chaînes protéiques à tendance antagoniste ou dans un site de large surface parce que nous avons suivi le même principe d'étude du raloxifène (RAL, qui co-cristallise avec la structure 1QKN_, Figure 45) qui est un antagoniste connu de ce récepteur.

Par contre, dans le cas du composé **2d'**, des scores élevés sont observés pour une dizaine de poses où la partie phényle est orientée strictement dans la poche C (plan vertical) malgré la contrainte (*templates*) imposée par le système de calcul (Figure 55, gauche).

Par conséquent, cette molécule sera intéressante à interpréter surtout après avoir obtenu des résultats biologiques puisqu'elle mime le comportement des molécules bi-phényles (par exemple : tamoxifène, raloxifène) ayant un cycle phényle dans le plan horizontal et un autre dans le plan vertical.

Une autre information est donnée par le dérivé **2c'**, toujours dans la même structure (Figure 55, droite). Ce dérivé après arrimage montre une pose dont l'encombrement semble être limite pour occuper la cavité dans le plan horizontal type. Au-delà (taille, branchements) l'encombrement est tel que le mode d'arrimage de **2d'** semble plus favorable au niveau de l'arrimage.

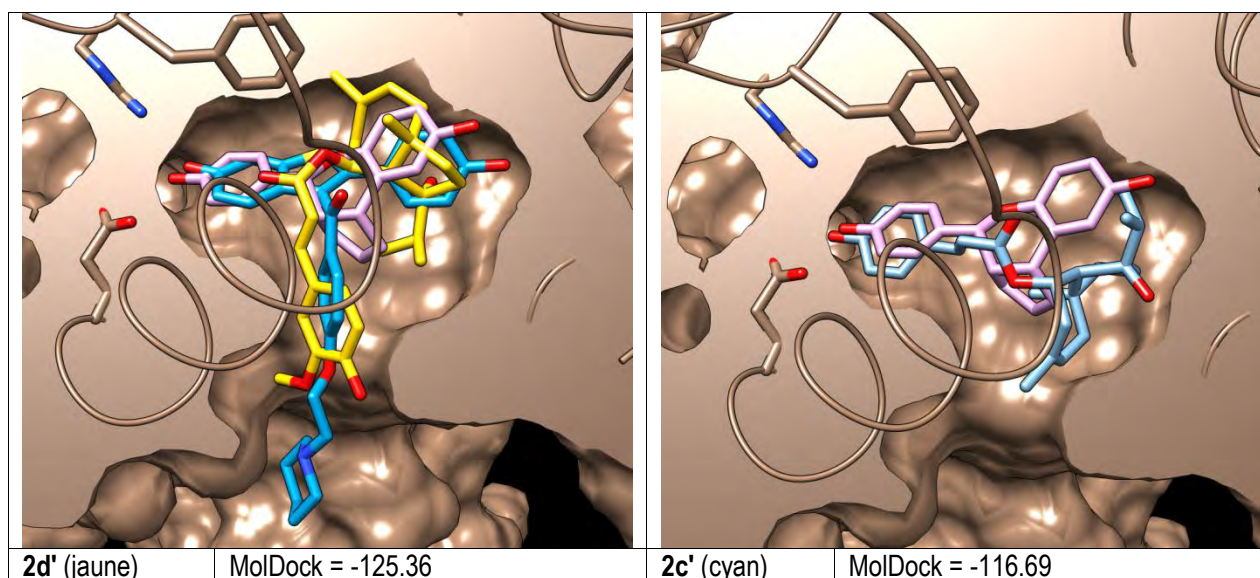


Figure 55 : Modes d'arrimage dans la structure 2I0Jc, incluant le ligand IOG (rose) co-cristallisé. Le raloxifène (RAL, bleu) issu de la structure 1QKN_ est superposé (après alignement des structures protéiques) à la pose de **2d'** dans 2I0Jc (image de gauche).

La Figure 55 montre que le composé **2d'** s'ajuste par sa partie phényle dans la poche C du plan vertical du site de liaison. Cet ajustement est identique à celui du raloxifène qui est un antagoniste connu des REs. Le seul motif manquant à ce composé est la présence d'un deuxième phényle dans le plan horizontal du site qui sera indispensable au processus de reconnaissance moléculaire du complexe protéine-ligand.

Ce type de résultat (extrapolable également au cas des RE α) ouvre des perspectives sur l'importance de la synthèse des molécules bi-phényle pour leur capacité à s'ajuster dans le site de liaison par leur premier motif phényle puis à redresser la molécule dans l'extension de la poche C à l'aide du deuxième phényle dans le but de déclencher leur activité antagoniste.

Au final, l'interprétation visuelle des résultats obtenus après calculs montre que les poses antagonistes sont celles qui occupent la totalité de la surface du site 2I0Jc.

Les 7 candidats sont donc capables de s'arrimer dans le site d'une structure 'antagoniste' 1X7R_ avec de bons scores et une forte conservation du motif phényle. Au sein de ce jeu de molécules, les composés **3c'**, **2c'** (et **2e'**) sont les analogues avec la plus grande probabilité d'exercer une fonction antagoniste puisqu'ils possèdent les meilleurs scores d'arrimage dans les protéines antagonistes (valeurs *CPC* très élevées dans 1X7R_).

La représentation visuelle des candidats **3c'** et **2c'** dans le site de la chaîne protéique antagoniste 1X7R_ est illustrée dans la Figure 56 ci-dessous :

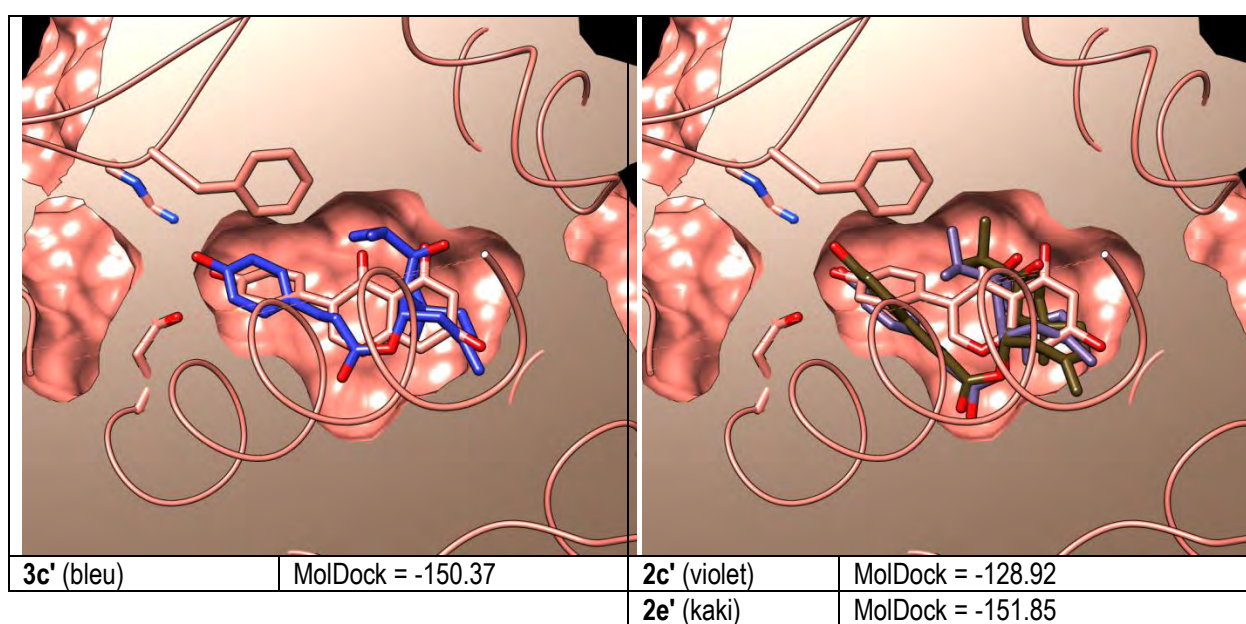


Figure 56 : Modes d'arrimage dans la structure 1X7R_, incluant le ligand GEN (saumon) co-cristallisé.

Les deux composés **3c'** et **2c'** occupent la surface complète du site et surtout la poche C, peut-être mieux que le ligand GEN co-cristallisé, ce dernier étant un agoniste/antagoniste des REs mais plus sélectif pour les RE β . On remarquera également les analogies de poses à l'intérieur de ce jeu de données entre les 3 ligands, mais aussi pour d'autres composés, vis-à-vis d'autres structures (par exemple **3a** dans U3Sa).

Si les résultats *in vitro* confirment les résultats d'arrimage, il sera intéressant de définir de nouveaux jeux de profils pharmacophoriques (*templates*) prenant en compte à la fois *i*) les données de la littérature ; *ii*) ces informations obtenues à partir des dérivés de la férutinine et *iii*) éventuellement la disponibilité d'une structure cristallographique ou la férutinine où l'un de ses composés seraient co-cristallisés avec un RE α/β .

Il faudra donc confronter ces résultats *in silico* avec des résultats *in vitro* ou *ex vivo*. S'il apparaît une corrélation entre activités calculées et activités expérimentales, ce type de résultat ouvre une voie vers le développement d'approches prédictives.

Ce chapitre montre également la difficulté d'adopter un protocole d'analyse des résultats qui soit le moins subjectif possible et permette de tirer les informations pertinentes à partir d'une masse de données mélangeant des variables complètement différentes : conformations, alignement de résidus, scores, ...

Les scores d'arrimage seuls ne permettent pas de discuter les résultats en termes d'affinité théoriques. Il faudra donc mettre au point *i)* de nouveaux indicateurs globaux (*CBP* et *CPC* sont des tentatives préliminaires) ; *ii)* des combinaisons (métriques) de scores d'arrimage et d'indicateurs et *iii)* compléter les résultats par d'autres calculs d'affinité. Par exemple, la nécessité d'obtenir une valeur de l'énergie ΔG (ou de constante d'équilibre d'association/dissociation) voire compléter par d'autres scores d'arrimage établis sur des bases différentes.

Ce travail montre qu'en terme de tri-sélection de poses, le gain obtenu par un protocole d'analyse normalisé, capable de tenir compte d'informations apportées par la biologie (par exemple conformité traduite par des indicateurs) pourrait être très supérieur à toutes les optimisations de méthodes d'arrimage (docking) ou de calcul d'affinités théoriques (scoring). Au cas où le nombre de molécules soumises à notre filtre *in silico* s'élève, cet investissement méthodologique sera précieux. En effet, en cas d'application de méthodes *in silico* sur des ligandothèques composées de millions de molécules, il est permis de s'interroger sur les faux positifs ou pertes de molécules issues de tels criblages. A la décharge des expérimentateurs, il est encore difficile d'implémenter ce type d'approches comportant beaucoup d'éléments manuels au sein de processus totalement automatisés.

Concernant les méthodologies d'arrimage proprement dit, il faut également rester prudent car les calculs sur des complexes RE α/β sont difficiles à la fois dans la mise en œuvre et dans l'interprétation. Il existe une flexibilité du récepteur (dynamique structurale) et des phénomènes qui conduisent peut-être à une adaptation induite au ligand. La forte plasticité de la protéine est démontrée par le nombre de molécules de structures très différentes qui sont capables de la lier. Dans cette étude, nous avons pris un certain nombre de précautions, notamment la sélection des structures canoniques après l'étude structurale de manière à modéliser cette plasticité du récepteur à un certain degré d'échantillonnage (5-6 structures par récepteur). Néanmoins, si une corrélation expérience-prédiction apparaît il serait tout à fait envisageable d'aller plus loin sur cette voie en augmentant le nombre de conformations qui

échantillonnent les variations structurales du récepteur. Plusieurs méthodes sont envisageables : dynamique moléculaire, modes normaux de vibration, différentes heuristiques, qui présentent l'avantage de faire des calculs rapides en mode flexible (protéine : résidus et «backbone» + ligand). Cependant, pour augmenter la résolution, le nombre de structures devrait être augmenté, donc le coût calculatoire, en sera d'autant plus élevé. Ce qui nécessite du matériel spécialisé et des méthodes d'accélération du calcul.

Dans le chapitre suivant, les résultats des activités biologiques *in vitro* de la férutinine et de ses analogues seront exposés et corrélés à ceux obtenus par l'arrimage moléculaire, l'obtention de valeurs *in vitro*, test direct sur la protéine, n'ayant pu être réalisée au cours de ce travail.

IV Etude biologique de la férutinine et de ses analogues sur la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses du sein

La férutinine possède un large spectre d'activités biologiques même si elle a été surtout étudiée pour ses effets œstrogéniques, responsables du potentiel aphrodisiaque de la plante (Zanoli P *et al.*, 2005 ; Zavatti M *et al.*, 2009). Actuellement, elle constitue un remède naturel aux traitement hormonal substitutif chez les femmes ménopausées (Palumbo C *et al.*, 2009). Compte tenu de ses propriétés à la fois agonistes et antagonistes vis-à-vis des REs, la férutinine peut être considérée en tant que SERM. Son effet anti-tumoral ainsi que celui des analogues naturels ou synthétiques reportés à ce jour ont été étudiés sur différentes lignées cancéreuses (Macho A *et al.*, 2004 ; Lhuiler A *et al.*, 2005 ; Poli F *et al.*, 2005 ; AlKhatib R *et al.*, 2008 ; Dall'Acqua S *et al.*, 2011 ; Kuete V *et al.*, 2012 ; Matin MM *et al.*, 2014 ; Arghiani N *et al.*, 2014). Les premiers travaux réalisés par Lhuiler *et al.* sur la lignée cancéreuse du sein MCF-7 montrent un effet cytotoxique de la férutinine à des concentrations élevées de 10 µg/ml (~28 µM) et un effet prolifératif à des basses concentrations 0,1-1 µg/mL (0,28-2,8 µM) (Lhuiler *et al.*, 2005). Tandis que dans des travaux plus récents, des effets antiprolifératifs variables : $CI_{50} = 2,47 \pm 0,34$ µg/mL (~7 µM) (Kuete V *et al.*, 2012) et $CI_{50} = 29$ µg/mL (81 µM) (Matin MM *et al.*, 2014) ont été reportés. Cette disparité des résultats pourrait s'expliquer par le statut hormonal de la lignée ainsi que par les conditions de cultures utilisées dans les différentes études.

D'une façon générale, les CI_{50} déterminées, sont relativement élevées par rapport à celle du tamoxifène usuellement utilisé dans le traitement du cancer de sein hormono-dépendant (Ikeda K *et al.*, 2002). Même si la férutinine présente une meilleure affinité vis-à-vis des REs par comparaison au tamoxifène, son pouvoir cytotoxique faible et ses effets œstrogéniques limitent son utilisation dans une thérapie anti-tumorale. L'amélioration de son pouvoir antagoniste pourrait augmenter son activité antiproliférative.

Des nouvelles stratégies thérapeutiques émergentes, apparaissent en permanence parmi lesquelles, la thérapie ciblée qui vise les cellules souches cancéreuses. La théorie de ces cellules souches est un point important à considérer quant à la recherche des composés anticancéreux. Il est toutefois nécessaire de sélectionner des candidats qui ciblent cette population réfractaire aux traitements conventionnels.

L'effet antiprolifératif de la férutinine sur les lignées cellulaires hormono-dépendantes et sur leur CSC ne sont pas jusqu'à présent bien élucidés.

Dans ce chapitre, une étude détaillée de l'activité anticancéreuse de la férutinine et des analogues hémisynthétiques que nous avons préparés sera menée sur différentes lignées cellulaires de cancer du sein.

Le chapitre englobe :

- l'activité antiproliférative de la férutinine et de ses analogues,
- l'effet de la férutinine sur le cycle cellulaire,
- les voies de signalisation activée par la férutinine,
- l'impact de la férutinine sur les cellules souches/progénitrices cancéreuse du sein.

IV.1 La férutinine est un inhibiteur potentiel de la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses du sein *in vitro*

Le cancer du sein est constitué d'un nombre hétérogène de cellules ce qui explique la disparité des réponses aux traitements observée d'une patiente à l'autre. Les modèles de lignées cellulaires utilisées pour évaluer les activités biologiques de la férutinine et de ses analogues sont :

- La lignée d'adénocarcinome mammaire humain œstrogéno-dépendante, **MCF-7**.

Cette lignée a été établie en 1970 à partir de l'épanchement pleural d'une patiente caucasienne de 69 ans, atteinte d'un cancer du sein métastatique (Soule HD *et al.*, 1973). Ces cellules présentent une morphologie épithéliale et ont conservé certaines caractéristiques de l'épithélium mammaire différencié comme l'expression de récepteurs cytoplasmiques aux œstrogènes et la capacité de former des dômes lorsqu'elles sont mises en culture.

- La lignée d'adénocarcinome mammaire humain œstrogéno-indépendante, **MDA-MB-231**.

Cette lignée provient également d'une effusion pleurale, d'une autre patiente caucasienne de 51 ans présentant un cancer du sein métastatique (Cailleau R *et al.*, 1974). Ces cellules ont gardé une morphologie épithéliale, mais n'expriment pas les récepteurs aux œstrogènes. Elles ont la capacité de former des tumeurs dans des souris « *nude* ».

Ces deux lignées représentent la variabilité cellulaire prédominante dans le tissu épithélial du sein. La prolifération de la lignée MCF-7 est sous la dépendance de l'œstrogène alors que celle de la lignée MDA-MB-231 est indépendante.

Dans notre étude, la viabilité et la prolifération des cellules cancéreuses ont été évaluées par deux tests basés sur deux concepts différents :

- Le test d'exclusion cellulaire au bleu de Trypan.
- Le test colorimétrique MTT [bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium].

Le test de bleu de Trypan permet d'observer directement l'effet de la férutinine sur la viabilité des lignées cellulaires en culture. Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 en phase exponentielle de prolifération, ont été traitées par différentes doses de la férutinine et sur plusieurs axes de temps afin de déterminer l'effet de ce composé sur la viabilité cellulaire par rapport au témoin (cellules sans traitement).

Des courbes dose-réponse (concentration en fonction des pourcentages d'inhibition) ont été tracées pour chaque lignée cellulaire afin de déterminer les CI_{50} . De plus, des courbes temps-effet (24 h, 48 h et 72 h) ont été réalisées pour sélectionner le temps adéquat pour détecter l'effet maximal de la férutinine sur les deux lignées cellulaires.

Le calcul de la viabilité cellulaire (rapport du nombre de cellules vivantes sur le nombre de cellules vivantes totales du contrôle) a été effectué.

Les résultats obtenus, montrent que des concentrations élevées en férutinine induisent un effet cytotoxique après 24 h de traitement : 10% et 18% des cellules pour MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement, restent vivantes après traitement par la férutinine à une concentration de 75 μ M. L'effet maximal du composé a été observé 72 h post-traitement (Figure 58 et Figure 59).

La férutinine possède un double effet sur la prolifération de la lignée cellulaire œstrogéno-dépendante, MCF-7 (Figure 58) :

- à des basses concentrations de 1 à 10 μ M, un effet prolifératif est observé,
- à des concentrations plus élevées (à partir de 30 μ M) un effet antiprolifératif est détecté.

La valeur de CI_{50} est de 38 μ M après 72 h de traitement. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature (Lhuiler A *et al.*, 2005).

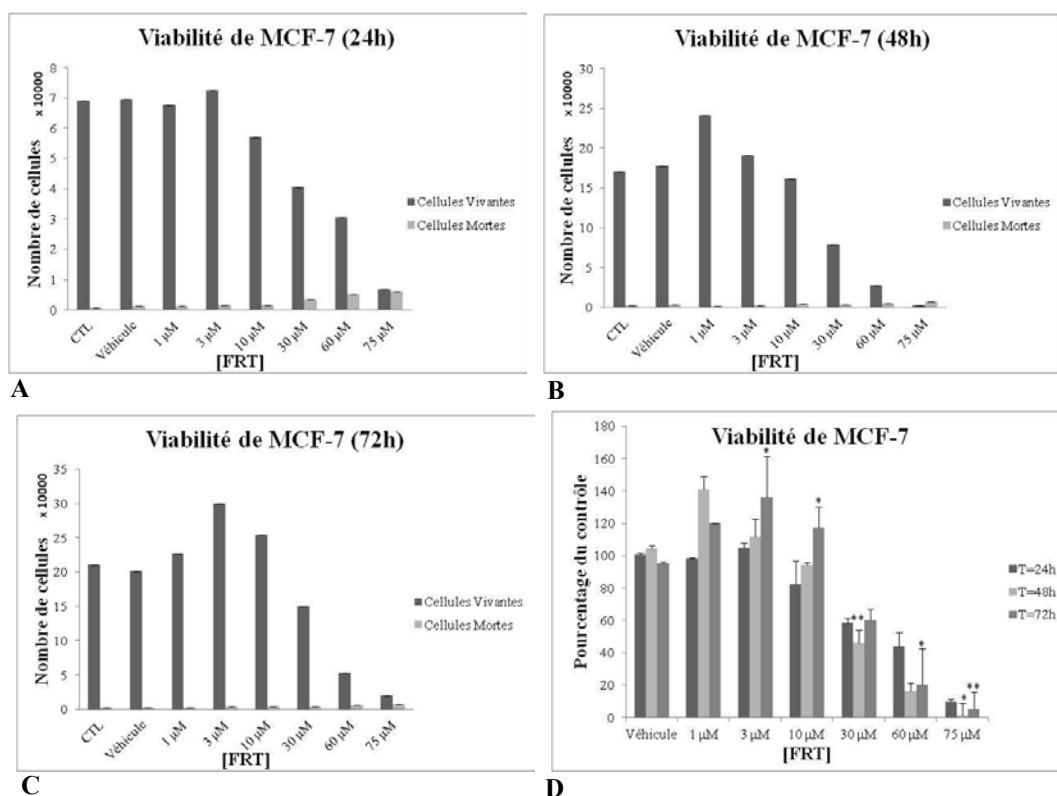


Figure 58 : Viabilité cellulaire de la lignée MCF-7 suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après (A) 24 h, (B) 48 h et (C) 72 h (A, B et C sont les résultats d'expériences représentatives). (D) Comparaison du pourcentage de la viabilité cellulaire par rapport au contrôle en fonction de la dose et du temps. Le traitement a été effectué 24 h après l'ensemencement des cellules à raison de 20 000 cellules/puits dans une plaque de 24 puits. Le comptage des cellules a été fait avec le bleu de Trypan en utilisant l'hemocytomètre. Chaque expérience a été réalisée en duplicata. * et ** indiquent une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test de Student).

D'autre part, la férutinine est capable d'inhiber la prolifération de la lignée œstrogéno-indépendante MDA-MB-231 d'une façon dose dépendante avec une CI_{50} de 28 μ M après 72 h de traitement (Figure 59).

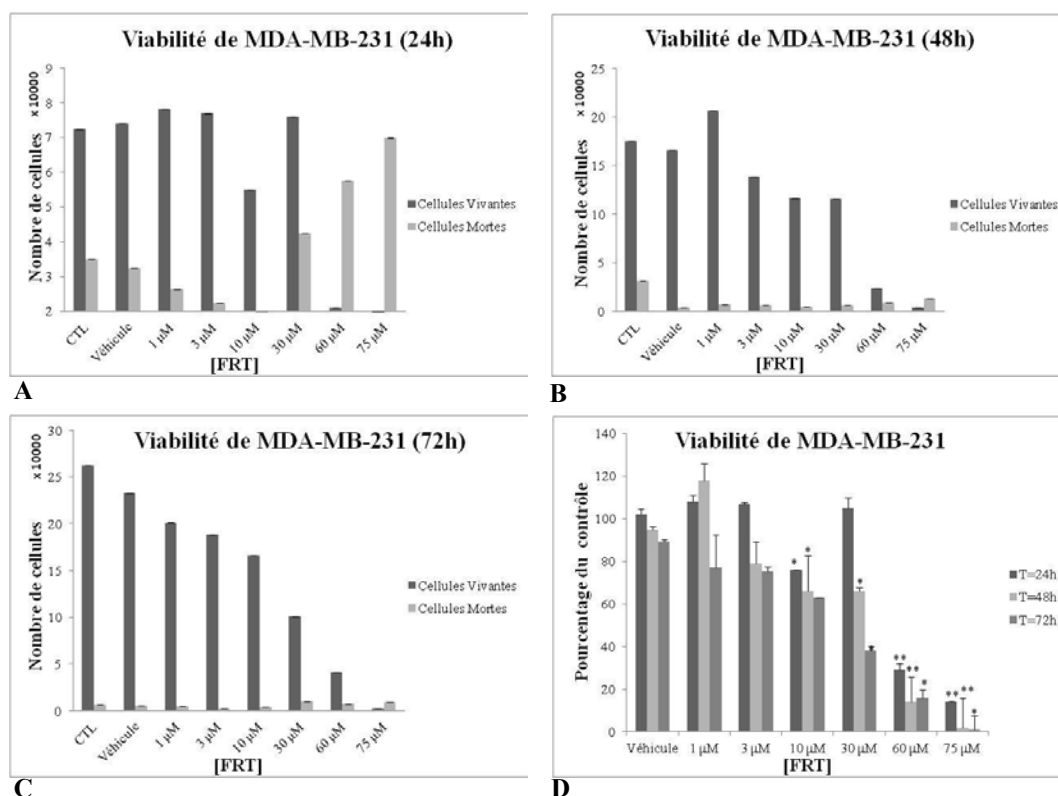


Figure 59 : Viabilité cellulaire de la lignée MDA-MB-231 suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après (A) 24 h, (B) 48 h et (C) 72 h (A, B et C sont les résultats d'expériences représentatives). (D) Comparaison du pourcentage de la viabilité cellulaire par rapport au contrôle en fonction de la dose et du temps. Le traitement a été effectué 24 h après l'ensemencement des cellules à raison de 18 000 cellules/puits dans une plaque de 24 puits. Le comptage des cellules a été fait avec le bleu de Trypan en utilisant l'hemocytomètre. Chaque expérience a été réalisée en duplicata. * et ** indiquent une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test de Student).

L'observation des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 en microscopie optique a permis de repérer les différences de morphologie induites par la férutinine. Dans la Figure 60, les photos B et E correspondent aux cellules traitées par la férutinine à 30 μ M, une réduction de la taille des cellules par rapport aux cellules contrôles (photos A et D) a été observée. Par ailleurs, à 60 μ M de traitement, les cellules sont mortes et détachées, laissant des débris cellulaire dans le milieu (photos C et F).

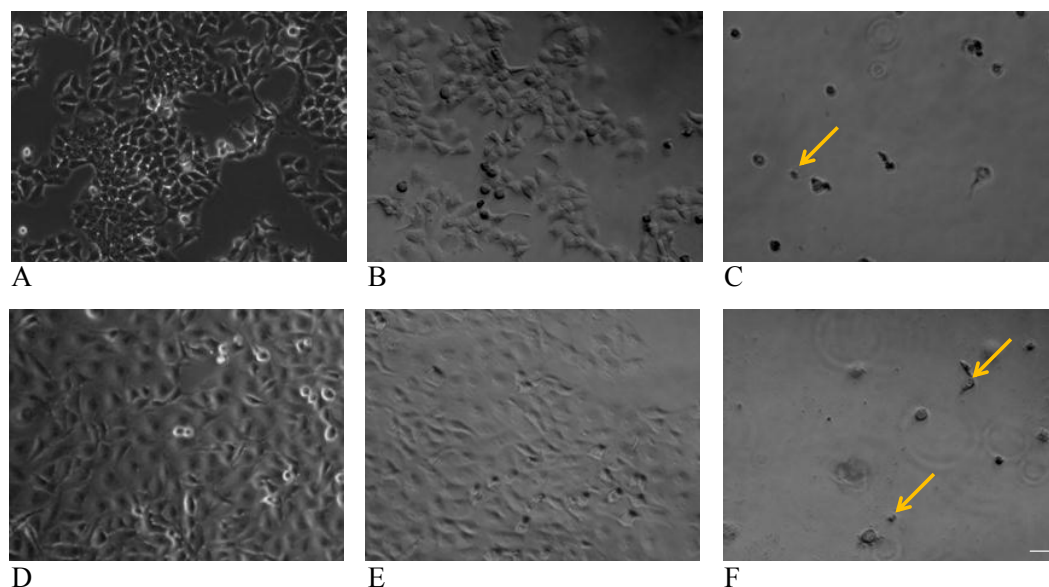


Figure 60 : Observation en microscopie optique des cellules cancéreuses du sein MCF-7 (A, B et C) et MDA-MB-231 (D, E et F) après traitement par la férutinine. (A) Cellules MCF-7 traitées par le véhicule DMSO ; (B) Cellules MCF-7 traitées par 30 μ M de férutinine ; (C) Cellules MCF-7 traitées par 60 μ M de férutinine ; (D) Cellules MDA-MB-231 traitées par le véhicule DMSO ; (E) Cellules MDA-MB-231 traitées par 30 μ M de férutinine ; (F) Cellules MDA-MB-231 traitées par 60 μ M de férutinine. Barre d'échelle, 20 μ m.

Le comptage des cellules mortes était possible seulement après 24 h de traitement surtout pour la lignée MDA-MB-231. Par ailleurs, une forte présence de débris cellulaires a été notée après 48 h et 72 h de traitement (Figure 60, flèches sur photos C et F).

D'autre part, l'activité antiproliférative de la férutinine a été confirmée par le test colorimétrique MTT (Sargent JM et Taylor CG, 1989). La coloration violette, proportionnelle au nombre de cellules vivantes, est mesurée par un spectrophotomètre. Le pourcentage de prolifération cellulaire a été calculé par rapport au contrôle.

Les résultats du test MTT exposés dans les Figure 61 et Figure 62 sont en concordance avec ceux obtenus par le test de bleu de Trypan. Les valeurs des CI_{50} trouvées sont identiques.

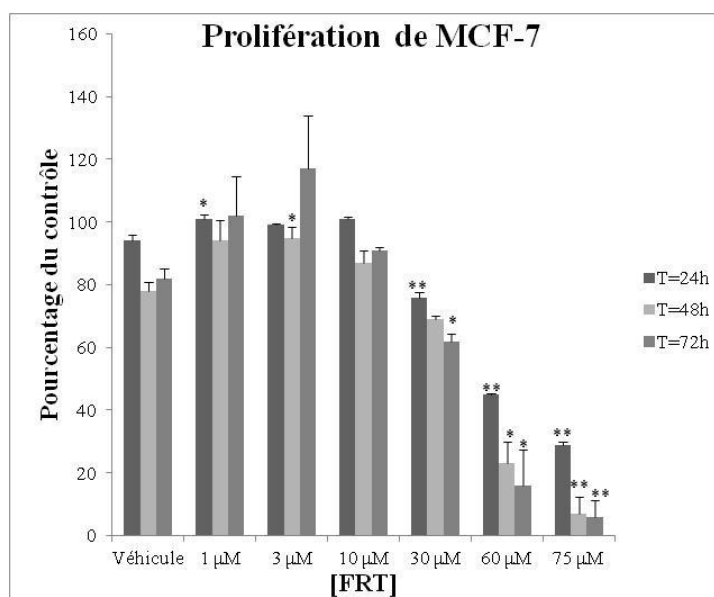


Figure 61 : Prolifération cellulaire de la lignée MCF-7 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après 24 h, 48 h et 72 h. Le traitement a été effectué 24 h après l'ensemencement des cellules à raison de 3000 cellules/puits dans une plaque de 96 puits. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 595 nm. Chaque expérience a été réalisée en triplicata. * et ** indiquent une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test de Student).

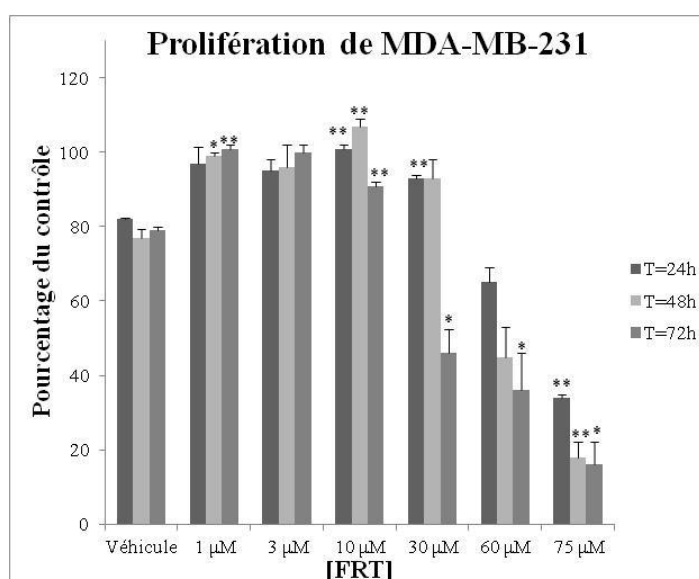


Figure 62 : Prolifération cellulaire de la lignée MDA-MB-231 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après 24 h, 48 h et 72 h. Le traitement a été effectué 24 h après l'ensemencement des cellules à raison de 3000 cellules/puits dans une plaque de 96 puits. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 595 nm. Chaque expérience a été réalisée en triplicat. * et ** indiquent une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test de Student).

La férutinine présente un effet biphasique sur la prolifération de la lignée cellulaire œstrogéno-dépendante du sein MCF-7 et un effet dose-dépendant sur la lignée œstrogéno-

indépendante MDA-MB-231, ce qui suggère que son effet prolifératif/antiprolifératif passe au moins par deux mécanismes d'action différents. Il est raisonnable de penser que l'effet prolifératif de la férutinine sur les cellules MCF-7 à des basses concentrations passe probablement par les REs.

En outre, les conditions de culture peuvent influencer la viabilité ou la prolifération des cellules MCF-7 après le traitement par la férutinine. En effet, le rouge de phénol contenu dans le milieu de culture RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) supplémenté de 10% par du sérum de veau fœtal (SVF) pourrait interférer avec l'activité de la férutinine à cause de sa faible activité œstrogénique (Berthois Y *et al.*, 1986). Pour éliminer toute interférence avec l'effet de la férutinine sur MCF-7, les propriétés anti-prolifératives de ce composé ont été testées dans un milieu jaune supplémenté de 10 % SVF traité au charbon actif (CSS, *Charcoal stripped serum*). Ce milieu est donc dépourvu de l'indicateur coloré, rouge de phénol, et des hormones stéroïdes existantes dans le sérum.

Le même effet biphasique que celui obtenu dans le milieu de culture standard, a été observé (Figure 63). La valeur de CI_{50} est du même ordre ($40 \pm 3 \mu M$) après 72 h de traitement.

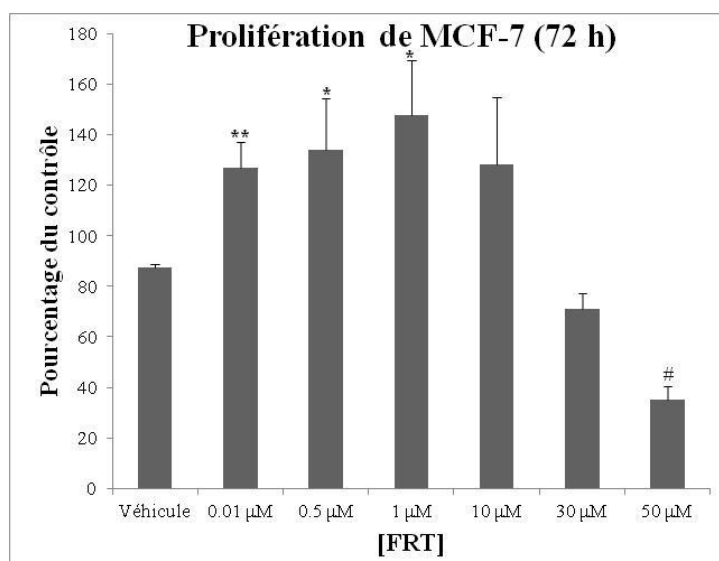


Figure 63 : Prolifération cellulaire de la lignée MCF-7 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après 72 h dans un milieu jaune CSS. Le traitement a été effectué 24 h après l'ensemencement des cellules à raison de 3000 cellules/puits dans une plaque de 96 puits. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 595 nm. Chaque expérience a été réalisée en triplicata. * ; ** et # indiquent une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,005$ respectivement (test de Student).

Dans la mesure où l'effet de la férutinine suit la même tendance dans les deux milieux de culture, l'étude est poursuivie dans le milieu de culture rouge standard.

IV.2 La férutinine induit une accumulation des cellules au niveau de la phase pré G0/G1 du cycle cellulaire

L'inhibition de la prolifération cellulaire pourrait s'expliquer par un ralentissement ou un arrêt du cycle cellulaire et/ou l'induction de l'apoptose. Une étude du cycle cellulaire des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 après traitement par la férutinine a donc été réalisée. L'analyse de l'influence du traitement par la férutinine sur la progression du cycle cellulaire des lignées MCF-7 et MDA-MB-231 a été effectuée. L'iodure de propidium (IP) est un agent d'intercalation utilisé comme marqueur des acides nucléiques. En cytométrie de flux, l'IP permet de distinguer facilement les cellules vivantes des cellules mortes. Sur la Figure 64 sont montrées les différentes phases du cycle cellulaire.

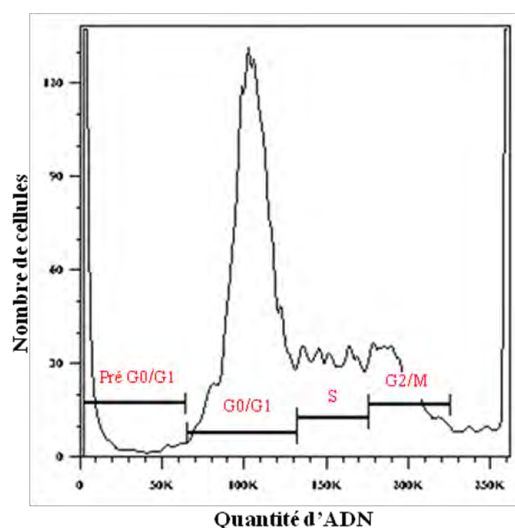


Figure 64 : Les différentes phases du cycle cellulaire

Les cellules ont été traitées par 30 et 60 μ M de férutinine pendant 24 h, 48 h et 72 h. Les concentrations choisies représentent la gamme où la férutinine exerce son effet anti-prolifératif. La répartition des cellules progressantes dans le cycle cellulaire est représentée sous forme d'histogramme.

Les résultats obtenus pour la lignée MCF-7 montrent qu'après 24 h de traitement, les cellules s'accumulent en phase pré G0/G1 comme l'indique la Figure 65 et la Figure 66. Le traitement par 30 μ M de férutinine entraîne l'accumulation de 26 % des cellules en pré G0/G1 par rapport au contrôle 17 % (24 h).

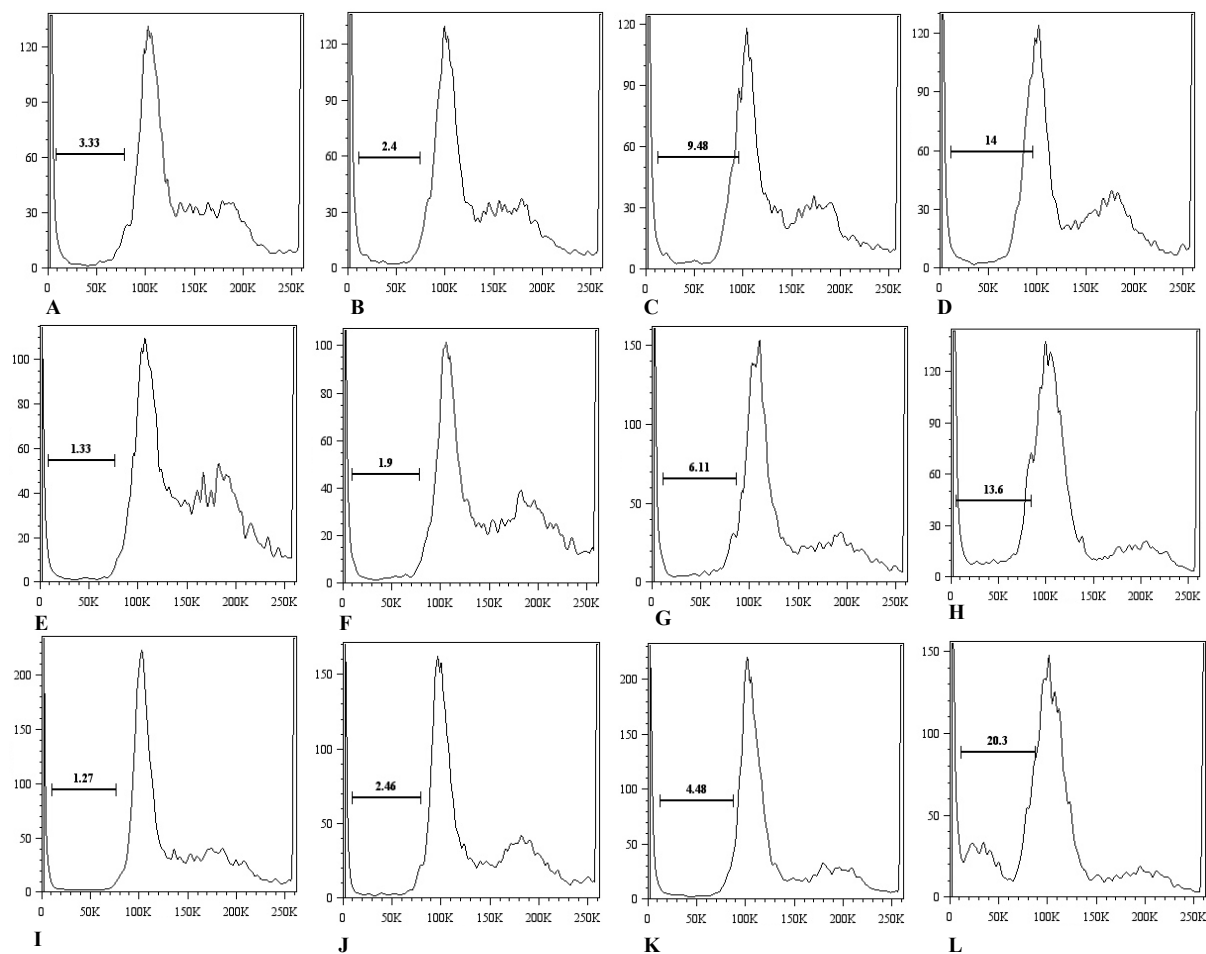


Figure 65 : Représentation du nombre de cellules MCF-7 en fonction de la quantité d'ADN suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations pendant 24 h, 48 h et 72 h. Le pourcentage marqué sur les graphes représente le nombre de cellules dans la phase pré G0/G1. (A→D) Contrôle, Véhicule, FRT 30 μ M et FRT 60 μ M après 24h de traitement ; (E→H) Contrôle, Véhicule, FRT 30 μ M et FRT 60 μ M après 48 h de traitement ; (I→L) Contrôle, Véhicule, FRT 30 μ M et FRT 60 μ M après 72 h de traitement.

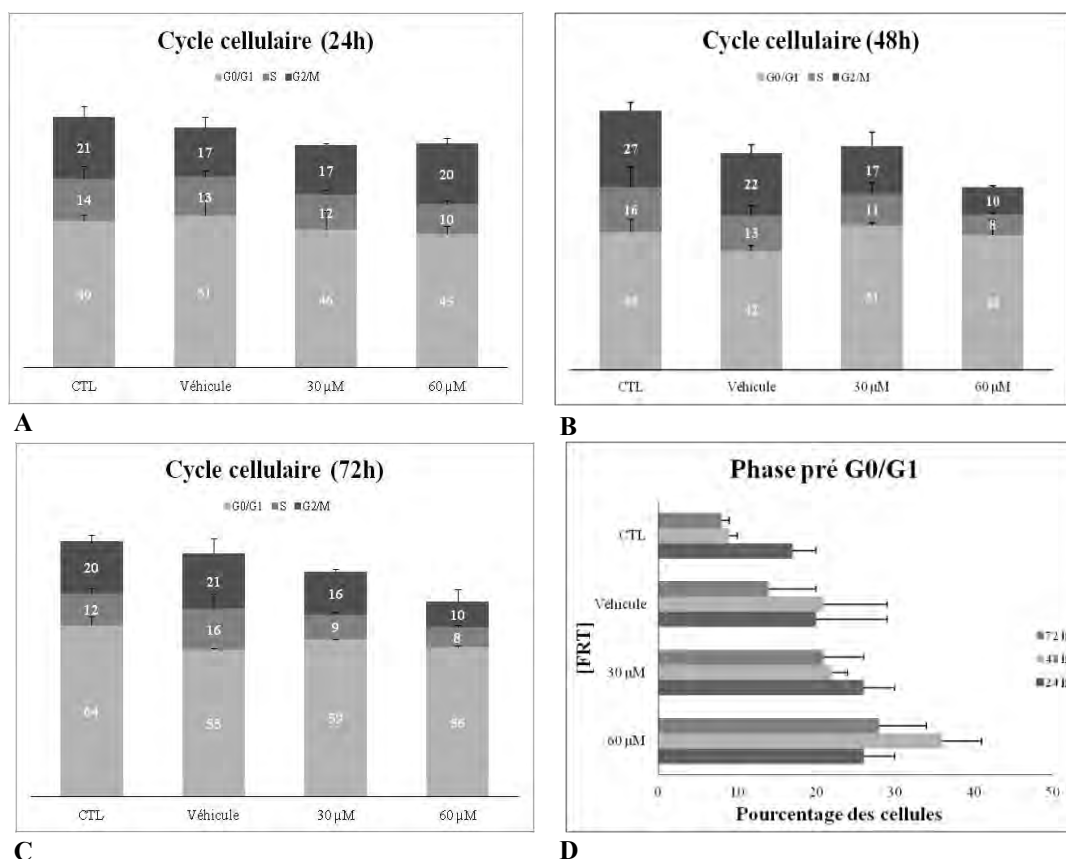


Figure 66 : Analyse de la progression dans le cycle cellulaire des cellules MCF-7 après traitement par la férutinine. Les cellules ont été traitées par 30 et 60 μ M sur différents intervalles de temps. Le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire a été déterminé à (A) 24 h, (B) 48 h et (C) 72 h post-traitement. (D) Répartition des cellules dans la phase pré G0/G1. La distribution dans les différentes phases du cycle cellulaire a été évaluée par cytométrie de flux après marquage par l'iodure de propidium. Les valeurs représentent la moyenne de deux expériences.

Cette accumulation est accentuée après 48 h puis 72 h de traitement, 21 % de cellules sont en phase pré G0/G1 après traitement par 30 μ M de férutinine comparé à 8 % pour les cellules non traitées (72 h).

D'autre part, la férutinine induit dans une moindre mesure un arrêt du cycle cellulaire au niveau de la phase G0/G1 dans le cas de la lignée cellulaire MCF-7. Une accumulation de cellules de 46 % (T=24 h), 51 % (T= 48 h) puis 59 % (T=72 h) a été observée avec 30 μ M de la férutinine (Figure 67).

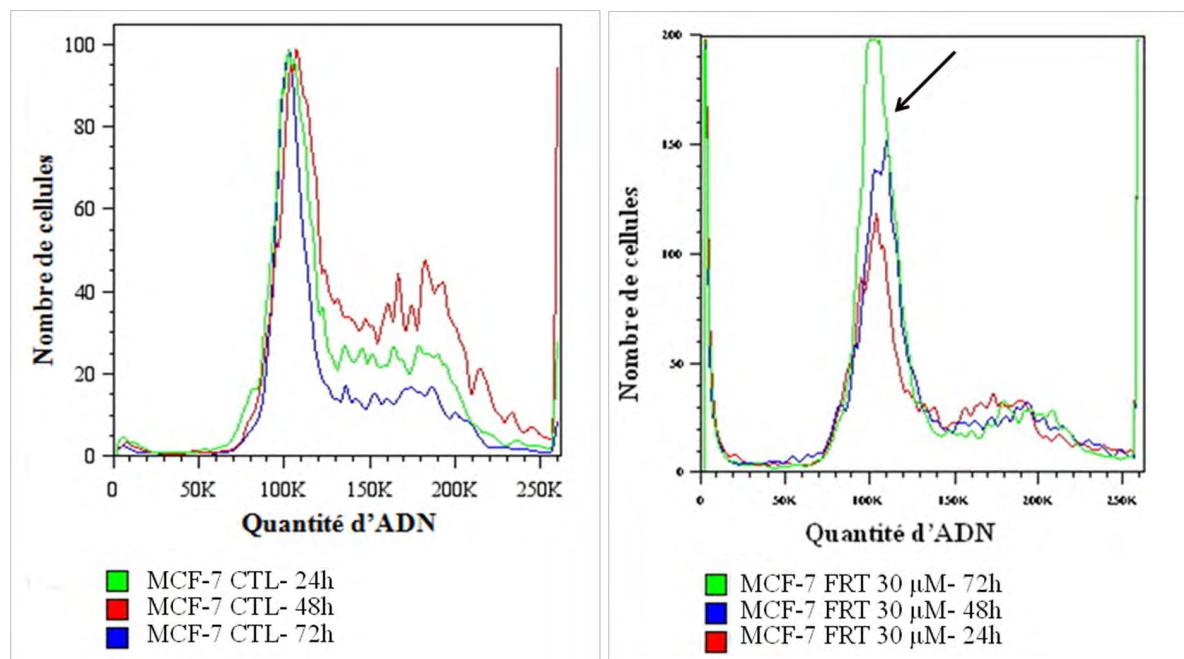


Figure 67 : Cycle cellulaire de la lignée MCF-7 après traitement par 30 µM de férutinine (droite) en comparaison avec le contrôle (gauche) pendant 24 h, 48 h et 72 h.

Les résultats obtenus pour la lignée MDA-MB-231 montrent qu'après 24 h de traitement, les cellules s'accumulent en phase pré G0/G1 comme l'indique la Figure 68 et la Figure 69. Le traitement par 30 µM de férutinine entraîne l'accumulation de 46 % des cellules en pré G0/G1 par rapport au contrôle 4 %.

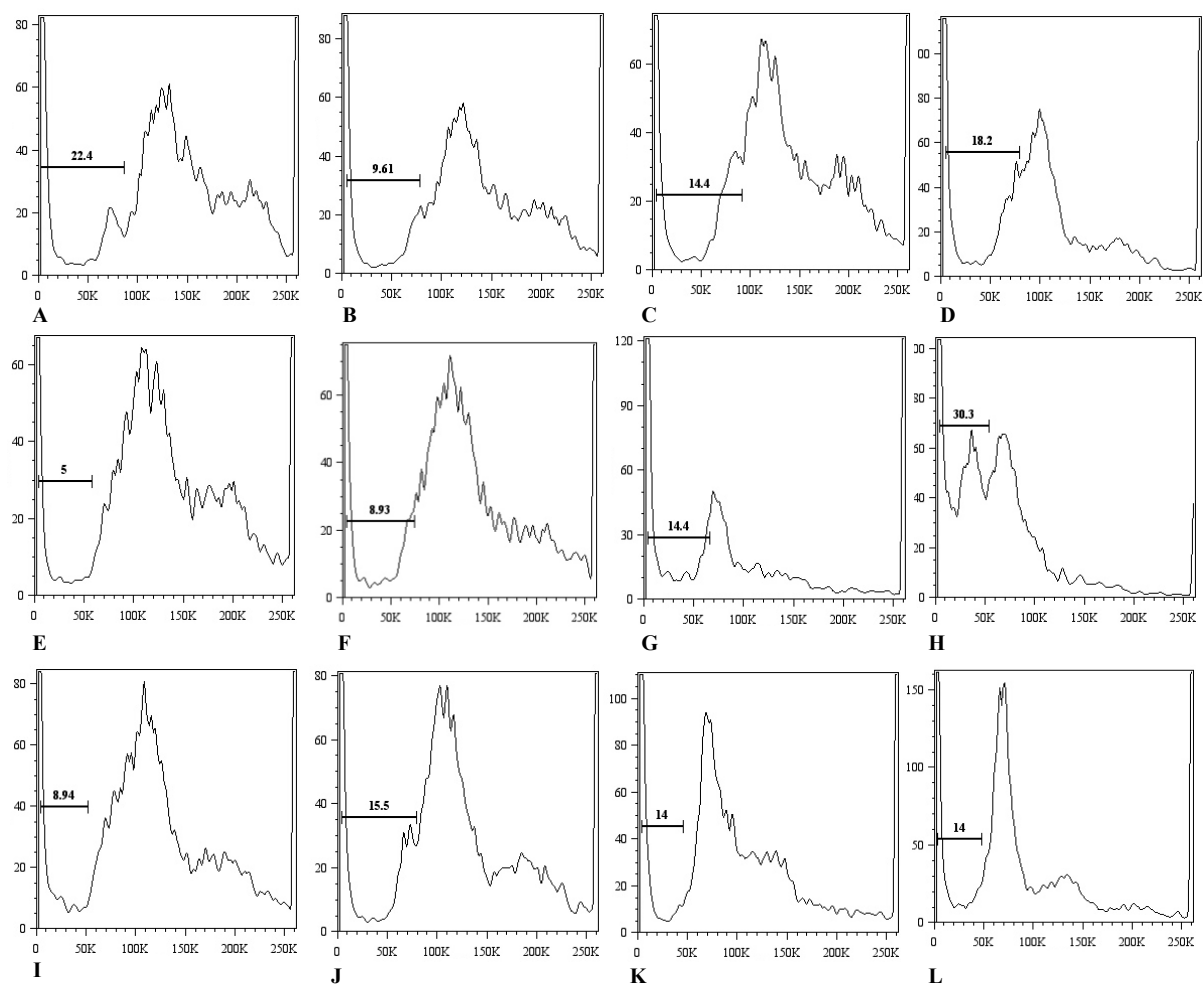


Figure 68: Représentation du nombre de cellules MDA-MB-231 en fonction de la quantité d'ADN suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations pendant 24 h, 48 h et 72 h. Le pourcentage marqué sur les graphes représente le nombre de cellules dans la phase pré G0/G1. (A→D) Contrôle, Véhicule, FRT 30 μ M et FRT 60 μ M après 24 h de traitement ; (E→H) Contrôle, Véhicule, FRT 30 μ M et FRT 60 μ M après 48 h de traitement ; (I→L) Contrôle, Véhicule, FRT 30 μ M et FRT 60 μ M après 72 h de traitement.

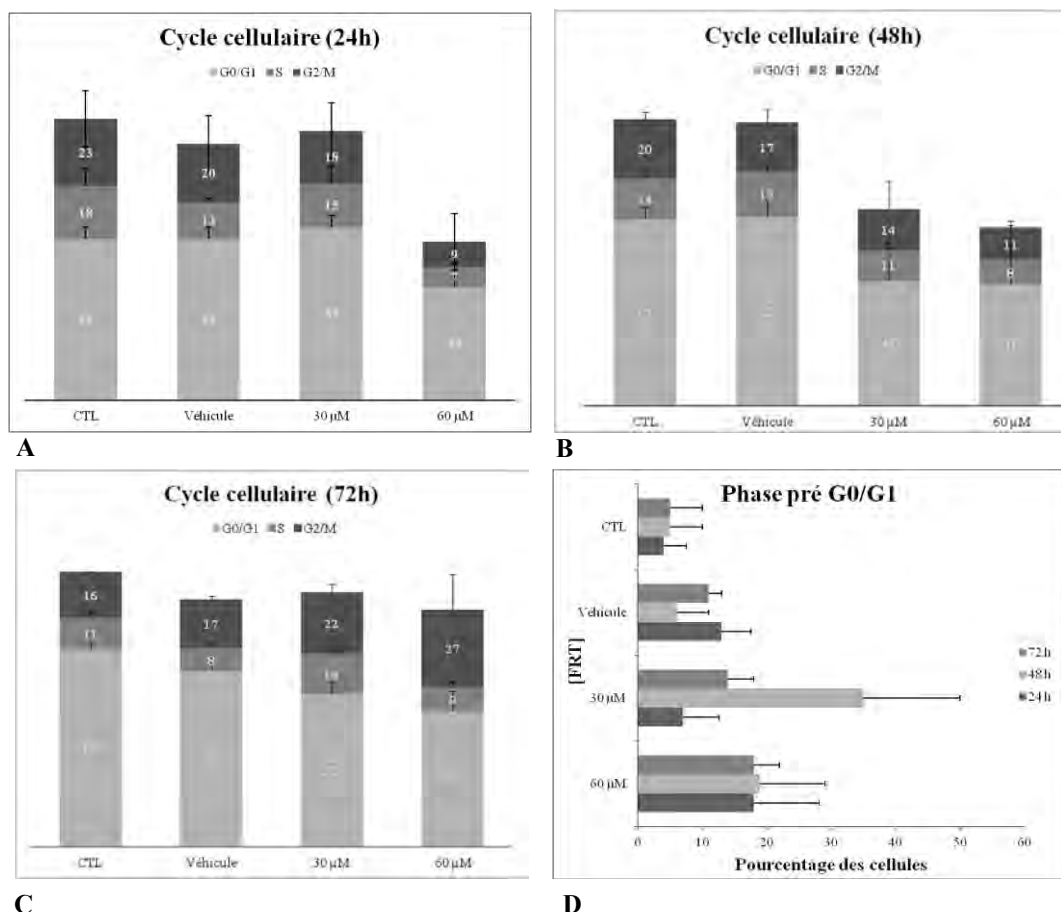


Figure 69: Analyse de la progression dans le cycle cellulaire des cellules MDA-MB-231 après traitement par la férutinine. Les cellules ont été traitées par 30 et 60 μ M sur différents intervalles. Le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire a été déterminé à (A) 24 h, (B) 48 h et (C) 72 h post-traitement. (D) Répartition des cellules dans la phase pré G0/G1. La distribution dans les différentes phases du cycle cellulaire a été évaluée par cytométrie de flux après marquage par l'iodure de propidium. Les valeurs représentent la moyenne de deux expériences.

Cette accumulation est accentuée après 48 h puis 72 h de traitement, 14 % des cellules sont en phase pré G0/G1 après traitement par 30 μ M de férutinine comparé à 5% pour les cellules non traitées (72 h). Cette population est le plus souvent associée à des cellules apoptotiques ce qui est cohérent avec l'observation sous microscope optique des cellules mortes. D'autre part, aucune variation au niveau du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2/M) n'a été observée.

La durée du cycle cellulaire ainsi que son déroulement sont contrôlés aux différents points de transition G1/S et G2/M mais aussi dans la phase S par des complexes protéiques appelés « *check points* ». L'arrêt du cycle cellulaire au niveau du point de transition G0/G1 dans les cellules MCF-7 suggère l'activation de la protéine suppresseur de tumeur p53 ainsi que de la protéine p21. En revanche, l'accumulation des cellules en phase pré G0/G1 observée

pour les deux lignées cellulaires suppose que la férutinine est un composé cytotoxique et non cytostatique.

IV.3 La férutinine induit la mort cellulaire par apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus physiologique par lequel des cellules surnuméraires ou dysfonctionnelles sont éliminées de l'organisme. Morphologiquement, l'apoptose correspond à une rétraction progressive de la cellule, avec condensation de la chromatine et du cytoplasme, suivie d'une fragmentation caractéristique de l'ADN. La membrane plasmique se bourgeonne et forme des corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule (Fan TJ *et al.*, 2005).

L'apoptose a été évaluée en étudiant l'intégrité du noyau cellulaire en recherchant des corps apoptotiques ou des fragments d'ADN. Ces derniers sont un évènement tardif de l'apoptose qui se déroule avant que les cellules ne soient phagocytées par les cellules environnantes. Une analyse morphologique préliminaire des cellules a été effectuée en utilisant la méthode de coloration par le 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochlorate (DAPI).

Le DAPI est un marqueur bleu fluorescent des acides nucléiques qui se lie aux régions adénine-thymine (AT) de l'ADN. Il permet la mise en évidence de la fragmentation de l'ADN. Il peut traverser les membranes intactes, mais il émet une coloration (détectable à 461 nm) plus intense lorsque les membranes sont perméabilisées.

Les cellules de la lignée MCF-7 présentent une perturbation de la morphologie de leur noyau suite au traitement par la férutinine. Une fragmentation de l'ADN ainsi qu'une formation des corps apoptotiques, typiques dans la phase précoce d'une mort programmée, ont été observées (Figure 70).

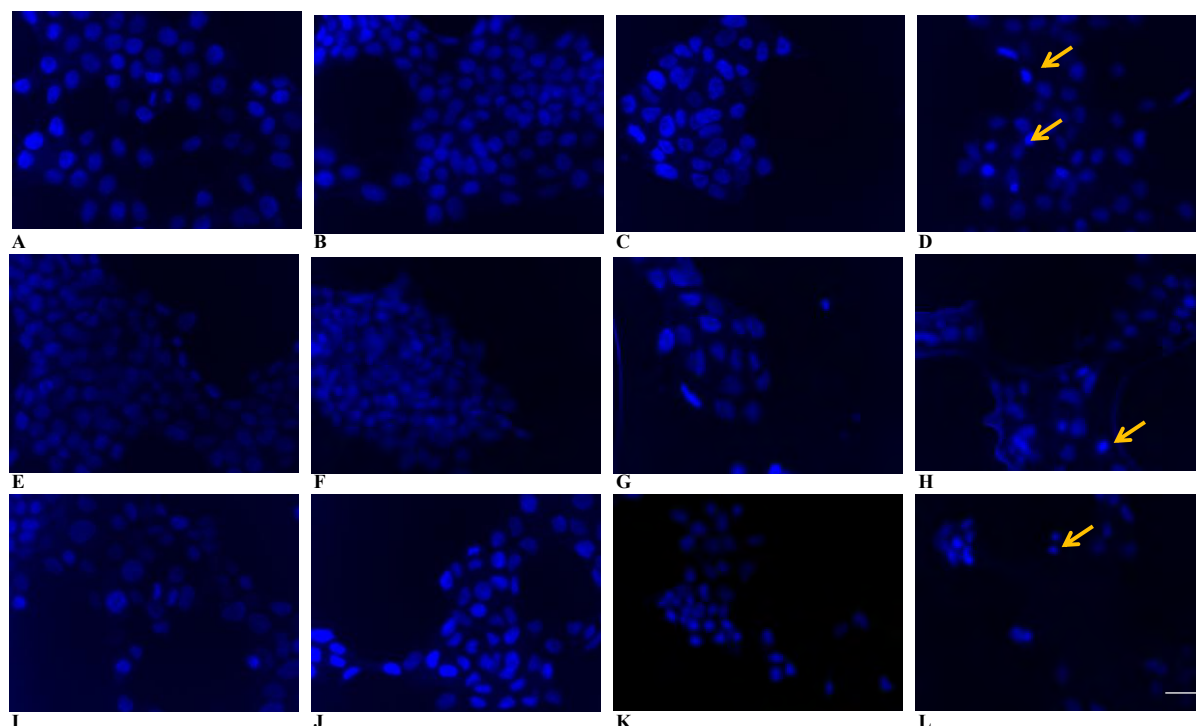


Figure 70 : Marquage par DAPI des cellules MCF-7 suite au traitement par la férutinine. Les cellules sont incubées en présence du DAPI pour T=24 h (**A→D**), T=48 h (**E→H**) et T=72 h (**I→L**). Les cellules fixées sur la plaque ainsi que les cellules du surnageant sont explorées sous microscope à fluorescence. **A, E, I** : Contrôle ; **B, F, J** : Véhicule ; **C, G, K** : FRT 30 μ M ; **D, H, L** : FRT 60 μ M. Barre d'échelle, 20 μ m.

De même, les cellules de la lignée MDA-MB-231 ont montré une perturbation de la morphologie de leur noyau suite au traitement avec la férutinine (Figure 71). Des cellules mortes ainsi que des bourgeonnements du noyau ont été observés suggérant l'induction de l'apoptose par la férutinine (Figure 72).

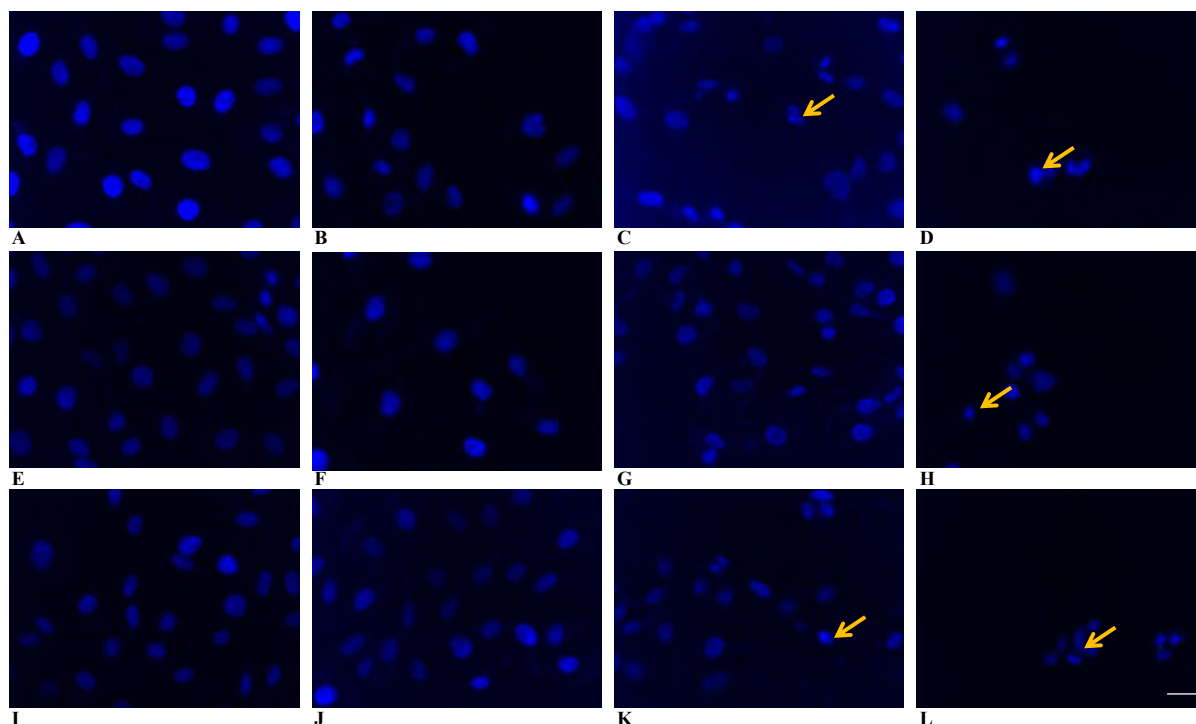


Figure 71 : Marquage par DAPI des cellules MDA-MB-231 suite au traitement par la férutinine. Les cellules sont incubées en présence du DAPI pour T=24 h (A→D), T=48 h (E→H) et T=72 h (I→L). Les cellules fixées sur la plaque ainsi que les cellules du surnageant sont explorées sous microscope à fluorescence. (A, E et I) Contrôle (B, F et J) Véhicule C, G, K : FRT 30 μ M; (D, H et L) FRT 60 μ M. Barre d'échelle, 20 μ m.

La Figure 72 illustre deux cellules apoptotiques en phase précoce (1) et en phase retardée (2). Dans le premier cas, le cytoplasme est fragmenté en plusieurs corps apoptotiques alors que dans le deuxième cas, la chromatine est très condensée, impliquant une fragmentation de l'ADN.

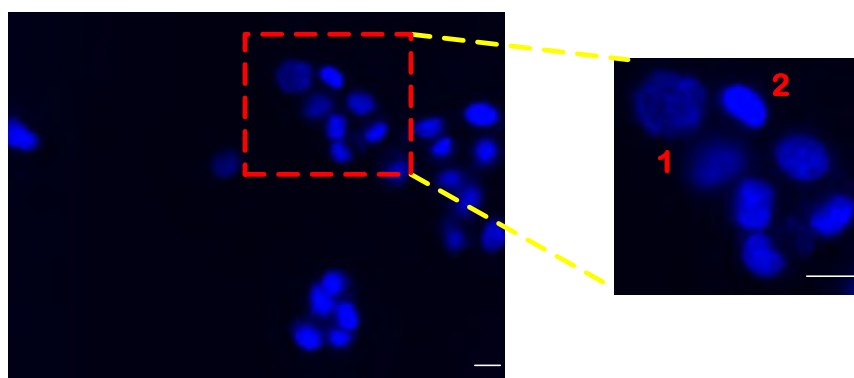


Figure 72 : Marquage par DAPI des cellules MDA-MB-231 suite au traitement par 30 μ M de férutinine. (1) cellule formant des corps apoptotiques ; (2) cellule morte. Barre d'échelle, 10 μ m.

Cette analyse de l'apoptose reste préliminaire. Elle se base uniquement sur le changement morphologique des cellules. L'étude devrait être complétée par la combinaison des deux marqueurs, annexine V/iodure de propidium, qui permettra de distinguer les

différentes sous-populations de cellules. Les cellules viables et apoptotiques précoces excluent l'IP. Les cellules apoptotiques précoces se distinguent par leur chromatine très condensée, alors que, les cellules nécrotiques émettent une fluorescence rouge par inclusion du l'IP.

Pour mieux comprendre par quelles voies de signalisation est induite l'apoptose après traitement par la férutinine, il sera nécessaire de rechercher les caspases activées (voie intrinsèque ou extrinsèque), les membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) tels que Bid et Bax, la famille anti-apoptotiques Bcl-xL (*B-cell lymphoma-extra large*) ou même les protéines apoptogènes (pro-caspases 2, 3 et 9, cytochrome C, endonucléase G, ...) (Fan TJ *et al.*, 2005). L'étude du taux de clivage de l'enzyme Poly ADP-Ribose polymérase (PARP) servirait aussi comme un marqueur de l'apoptose. En effet, la protéine PARP, impliquée dans la réparation de l'ADN, est une enzyme nucléaire mais aussi le substrat des caspases-3 et 7 activées durant la mort cellulaire programmée.

IV.4 La signalisation de la férutinine se fait en partie par le biais des récepteurs aux œstrogènes

Les récepteurs nucléaires constituent des outils fort intéressants dans le traitement anti-hormonal. Les antagonistes des REs produisent une inhibition de l'action des récepteurs et de la transcription des gènes de survie cellulaire qui s'en suivent. C'est le cas du tamoxifène qui est un puissant agent cytotoxique utilisé dans la thérapie actuelle en tant qu'antagoniste des REs dans le cancer de sein (Medina P *et al.*, 2004).

La férutinine est capable de déplacer l'œstradiol de son site de liaison mais dispose d'une affinité 10 fois moins importante que le ligand naturel. Elle est un composé agoniste du RE α et un agoniste/antagoniste du RE β (Ikeda K *et al.*, 2002). D'autre part, la férutinine possède un double effet prolifératif/antiprolifératif sur la lignée hormono-dépendante MCF-7. L'effet antiprolifératif de ce composé a été expliqué par l'induction de l'apoptose. Nous cherchons alors à comprendre son effet prolifératif.

En effet, l'action des REs est modulée par des modifications post-traductionnelles, parmi lesquelles, la phosphorylation des deux récepteurs est corrélée à la réponse clinique du traitement (Lam HM *et al.*, 2012).

Les deux récepteurs inactifs par leur liaison aux protéines Hsp90 seront activés, suite à leur liaison à l'œstradiol, par des phosphorylations entraînant leur translocation dans le noyau et l'activation de la machinerie transcriptionnelle.

Le RE α est phosphorylé au niveau des sites multiples d'acides aminés. Par exemple, en réponse à la liaison de l'œstradiol, le RE α est phosphorylé majoritairement par la kinase MAPK au niveau de la serine (Ser)-118 et à moindre mesure au niveau des Ser-104 et Ser-106. Ces résidus sérines sont présents dans la région AF-1 du domaine N-terminal du récepteur.

D'autre part, le rôle des phosphorylations au niveau du RE β n'est pas complètement élucidé (Lam HM *et al.*, 2012). Il est récemment connu, par exemple, que les phosphorylations de la Ser-105 dans le domaine N-terminal du RE β sont majoritairement sous la dépendance des kinases p38 et ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase*). Les phosphorylations au niveau du RE β inhibent la migration et l'invasion cellulaire (Lam HM *et al.*, 2012). En effet, la présence de la phospho Ser-105 au niveau du sein est associée à un bon pronostic de la maladie (Hamilton-Burke W *et al.*, 2010).

L'effet de la férutinine sur la phospho Ser-118 la plus récurrente du RE α ainsi que sur la phospho Ser-105 du RE β a été étudié par «Western blot». Différentes concentrations de férutinine ont été testées à 1 h, 6 h et 48 h post-traitement de la lignée cancéreuse MCF-7. Les deux premiers timing ont été choisis pour évaluer la signalisation précoce, directement activée par la férutinine alors que le troisième point a été adopté dans le but de suivre l'effet retardé de ce composé (Figure 73).

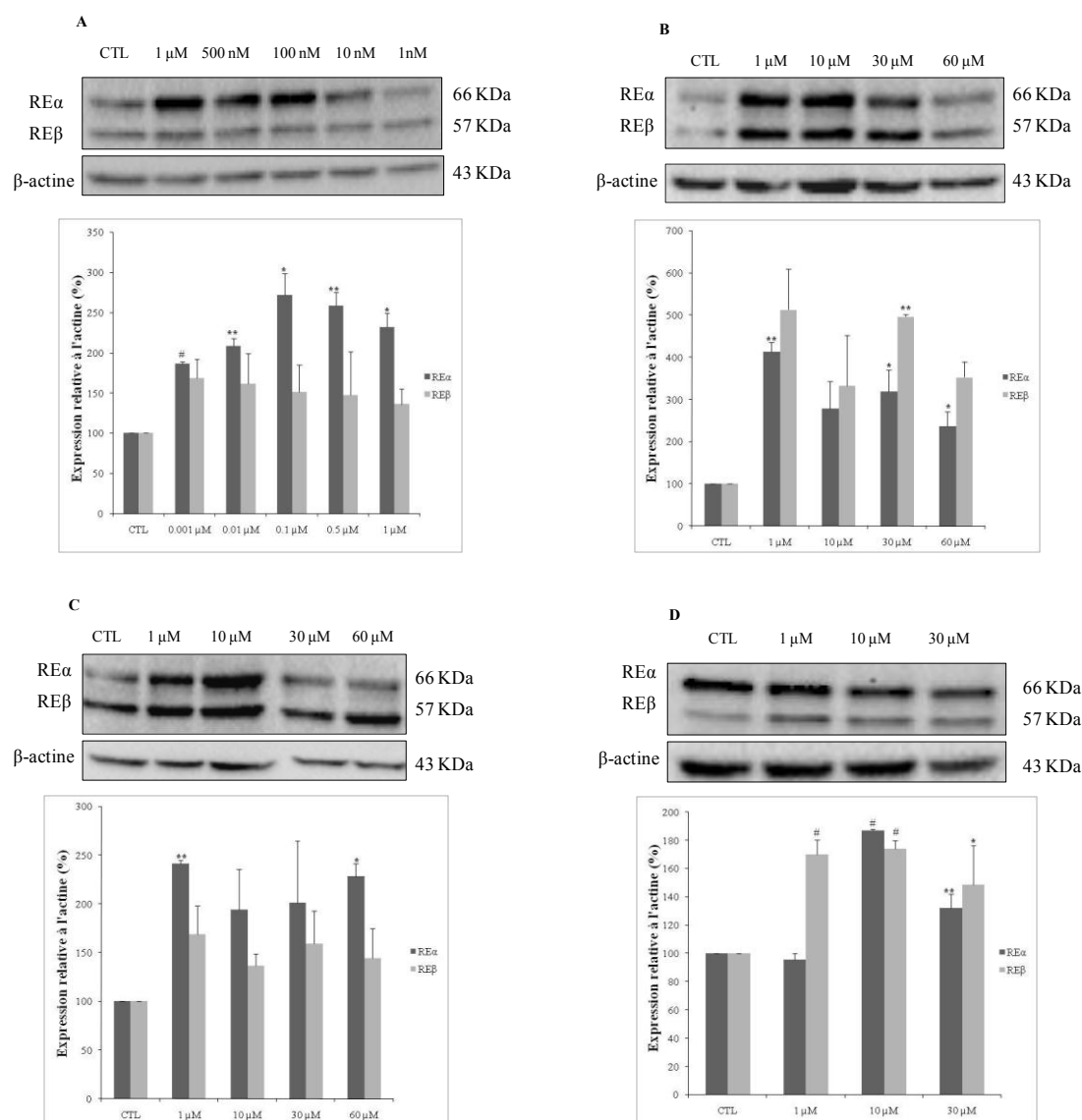


Figure 73 : Analyse de l'expression des REα/β phosphorylés dans le cas de la lignée MCF-7 par « western blot » en fonction de la concentration en férutinine administrée. L'expression des protéines a été suivie à trois intervalles de temps différents. (A et B) Analyse de l'expression des REs après 1 h de traitement par la férutinine ; (C) Analyse de l'expression des REs après 6 h du traitement par la férutinine ; (D) Analyse de l'expression des REs après 48 h du traitement par la férutinine. CTL= cellules non traitées. L'analyse par densitométrie a été obtenue après normalisation de l'expression des REs par rapport à celle de l'actine. Les anticorps utilisés sont le phospho-Ser 118 anti REα et le phospho-Ser 105 anti REβ. Chaque expérience a été réalisée en duplicata. * ; ** et # indiquent une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,005$ respectivement (test de Student).

Les résultats obtenus pour REα montrent que le profil de phosphorylation induit par la férutinine diffère suivant les intervalles de temps étudiés. Après 1 h de traitement, la férutinine stimule la phosphorylation du REα à des concentrations allant de 10 nM jusqu'à 10 μM tandis qu'elle inhibe cette phosphorylation à des concentrations plus élevées (à partir de 30 μM) (Figure 73, A et B). Même si la férutinine inhibe la phosphorylation à des

concentrations élevées, le taux d'expression de la phospho-RE α reste 3,5 fois plus élevé que celui des cellules contrôles. Cette tendance est maintenue après 6 h avec un taux de phosphorylation qui diminue, puis disparaît après 48 h de traitement (Figure 73, **C** et **D**). A titre d'exemple, le taux de phosphorylation du RE α diminue de 350 % jusqu'à 200 % par rapport au contrôle en passant de 1 h à 6 h post-traitement à une même concentration de 10 μ M en férutinine. Cette activation/inhibition de la phosphorylation du récepteur observée après 1 h et 6 h de traitement concorde avec l'effet biphasique observé après traitement de la lignée cancéreuse MCF-7 par la férutinine à basse (10 μ M) et plus haute concentration (30 μ M).

La perte de l'effet après 48 h de traitement suggère l'activation d'autre(s) voie(s) de signalisation, probablement apoptotiques induisant l'apparition des cellules mortes. A noter que les REs ont un temps de demi-vie de 4 à 5 h s'ils ne sont pas liés à un ligand. Cependant, la liaison de l'œstradiol ou d'antagonistes comme le fulvestrant aux récepteurs diminue le temps de demi-vie jusqu'à 3 h et 0,5 h, respectivement (Wijayaratne AL et McDonnell DP, 2001). Ce « *turn over* » protéique pourrait être aussi à la base de la différence d'activité observée après 6 h et 48 h de traitement.

En ce qui concerne le RE β , son taux d'expression augmente d'une façon presque stable après 1 h jusqu'à 48 h de traitement quelle que soit la concentration de la férutinine. Durant ces trois intervalles de temps, la fluctuation du taux d'expression de la protéine phosphorylée s'étale entre 150 % et 500 %. Le RE β est alors continuellement activé par la férutinine, ce qui suggère que cet isoforme contribue à l'effet antiprolifératif du composé. D'autre part, le pouvoir de la férutinine à déplacer l'E2 de son site de liaison aux REs a été évalué suite à la présence simultanée dans le même milieu de culture des deux composés. L'expérience consiste à co-traiter les cellules MCF-7 avec 1nM d'E2 et des concentrations croissantes de la férutinine allant de 1 jusqu'à 60 μ M. Les valeurs des constantes de liaison de l'E2 au REs montrent que ce dernier se fixe en premier lieu aux RE α (CI₅₀ = 3,2 nM) et aux RE β (CI₅₀ = 14,6 nM) (Ikeda K *et al.*, 2002). L'affinité de la férutinine vis-à-vis des ER α reste inférieure à celle du ligand naturel E2 (CI₅₀ = 33,1 nM). Le taux d'expression des phospho-REs a été ensuite analysé (Figure 74).

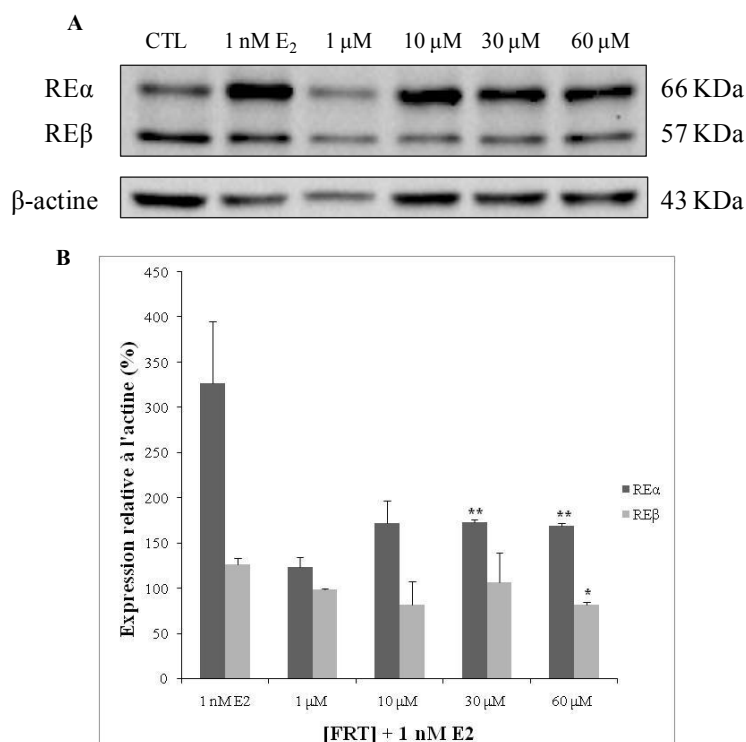


Figure 74 : Analyse de l'expression des REα/β phosphorylés dans le cas de la lignée MCF-7 par « western blot » en fonction de la concentration en férutinine + 1 nM E₂. (A) Membrane montrant l'expression des REs après 1 h de traitement ; (B) Analyse par densitométrie après normalisation de l'expression des REs par rapport à celle de l'actine. CTL= cellules non traitées. Chaque expérience a été réalisée en duplicata. * et ** indiquent une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test de Student).

Les résultats montrent que la férutinine ajoutée en co-traitement avec l'E₂ (1nM) diminue de moitié la phosphorylation des REs. En effet, l'E₂ stimule l'activation des récepteurs REα et augmente leurs formes phosphorylées jusqu'à 400 %. Cependant, l'ajout de la férutinine au milieu diminue cette forme jusqu'à 200±60 % indépendamment de la concentration. La férutinine entre alors en compétition avec l'E₂ dans sa liaison aux REs. Par contre, l'isoforme REβ n'est pas phosphorylée (avec ou sans férutinine dans le milieu). La phosphorylation des récepteurs est modulée alors par l'ajout de la férutinine au milieu contenant déjà de l'E₂ dans le cas de MCF-7. Ces résultats appuient le fait que l'effet de la férutinine passe par les REs.

L'analyse de l'expression des phospho-REs dans la lignée MDA-MB-231 a été aussi effectuée suite au traitement par la férutinine (pour 1 h), dans la mesure où cette lignée possède une faible expression des REβ (Figure 75).

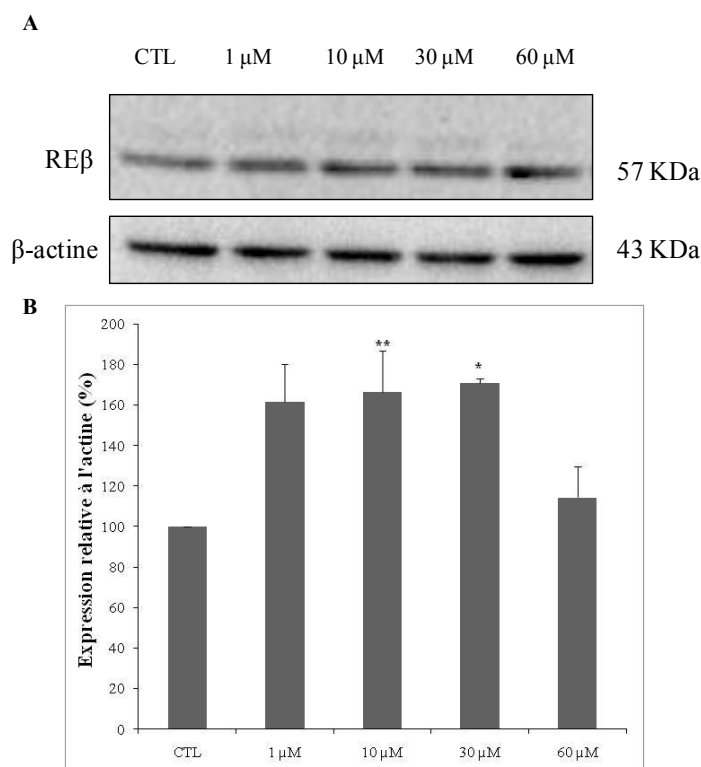


Figure 75 : Analyse de l'expression des RE β phosphorylés de la lignée MDA-MB-231 par « western blot » en fonction de la concentration en férutinine (1 h de traitement). (A) Membrane montrant l'expression des RE β ; (B) Analyse par densitométrie après normalisation de l'expression du RE β par rapport à celle de l'actine. CTL= cellules non traitées. Chaque expérience a été réalisée en duplicata. * et ** indiquent une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test de Student).

Les résultats montrent une phosphorylation constitutive du RE β allant du contrôle jusqu'à la concentration la plus élevée en férutinine. Aucune corrélation significative n'a pu être établie. Cependant, Lam HM *et al* ont démontré récemment que les cellules MDA-MB-231 expriment d'une façon endogène le récepteur phospho Ser-105 (Lam HM *et al.*, 2013). Le mode d'action de la férutinine dans cette lignée cellulaire nécessite une investigation plus ciblée sur les voies de signalisation de la survie cellulaire. Dans ce contexte, la recherche du niveau d'expression, d'activation ou d'inhibition des protéines des voies MAPK et PI3K (*phosphoinositide-3-kinase*), pourraient éventuellement éclaircir le mode d'action de la férutinine sur cette lignée.

Pour confirmer les résultats obtenus pour la lignée cellulaire MCF-7, une analyse du profil transcriptionnel des gènes activés par la férutinine serait nécessaire. De plus, une étude détaillée du transcriptome des gènes communs à la lignée MCF-7 permet d'établir un profil comparatif des gènes qui répondent à la stimulation par l'E2 ou par la férutinine. L'activité transcriptionnelle des REs pourrait être mesurée à l'aide du gène rapporteur de la luciférase. Les cellules transfectées par la région consensus ERE (séquence des gènes régulés par

l'œstradiol) répondront à l'action de l'œstradiol dans le milieu par l'augmentation de la transcription des gènes de survie cellulaire correspondants. La férutinine introduite dans le milieu entrera en compétition avec l'œstradiol pour la liaison aux REs. Une modification de l'activité de la luciférase sera observée, ce qui modifie la signature transcriptionnelle des cellules. Toutefois, il est possible de décrypter si le mécanisme d'action de la férutinine se fait par le biais des récepteurs en transfectant le gène du RE α correspondant dans les cellules MDA-MB-231. La prolifération cellulaire ainsi que l'étude de la variation des gènes de survie cellulaire peuvent être analysées suite à la transfection.

La phosphorylation des REs est l'événement primaire de l'activation des voies de signalisation dépendantes de ces récepteurs. L'activation des REs aboutira à leur translocation dans le noyau en vue d'activer les gènes de survie cellulaire. Cette translocation ne peut pas être détectée par immunoblotting, c'est pourquoi une analyse par immunomarquage des RE α a été faite pour tracer le trafic des récepteurs du cytoplasme ou de la membrane cytoplasmique vers le noyau dans le cas de la lignée cellulaire MCF-7 (Figure 76).

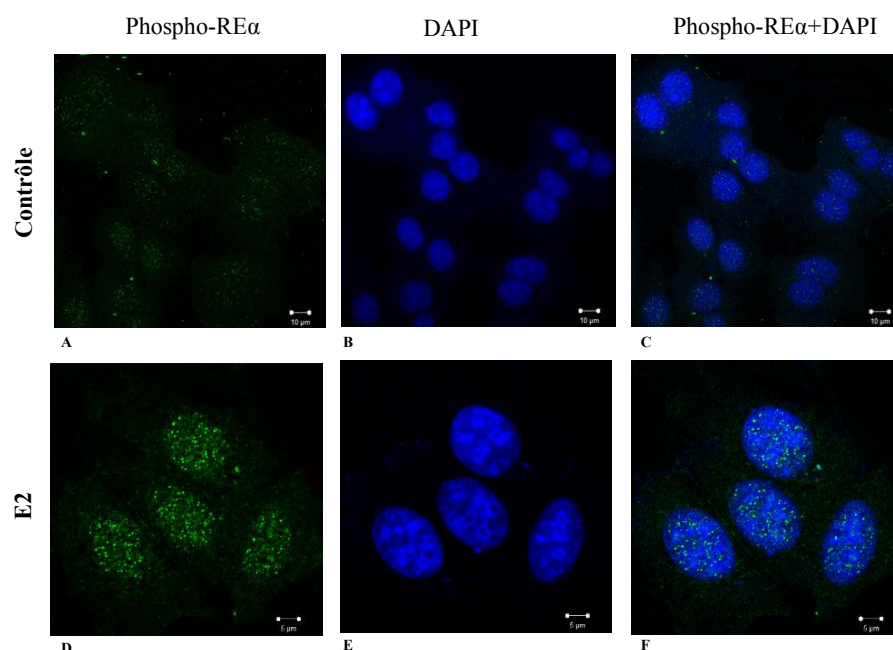


Figure 76 : Marquage par immunofluorescence des cellules MCF-7. (A, B et C) Cellules contrôles dans le milieu de culture sans traitement ; (D, E et F) Cellules traitées par 1 nM d'E2 pendant 1h. Les cellules ont été marquées par immunofluorescence avec un anticorps anti-RE α phospho-Ser 118 (AlexaFluor 488, vert). Les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu). Le marquage est visualisé par microscopie confocale. Barres d'échelle, 10 et 5 μ m.

Comme le montre l'immunoblot, la phosphorylation du RE α est stimulée après 1 h de traitement. Les cellules MCF-7 traitées par l'E2 aboutissent à une phosphorylation des RE α

ainsi qu'à leur translocation dans le noyau (Figure 76 **A**, **B** et **C**) en comparaison avec le contrôle Figure 76 **D**, **E** et **F**). Ces deux conditions (traitement avec E2 et contrôle) constitueront respectivement le contrôle positif et négatif des expériences avec la férutinine. Les différentes concentrations de férutinine ont été ajoutées aux cellules MCF-7 pendant 1 h (Figure 77) et 6 h (Figure 78).

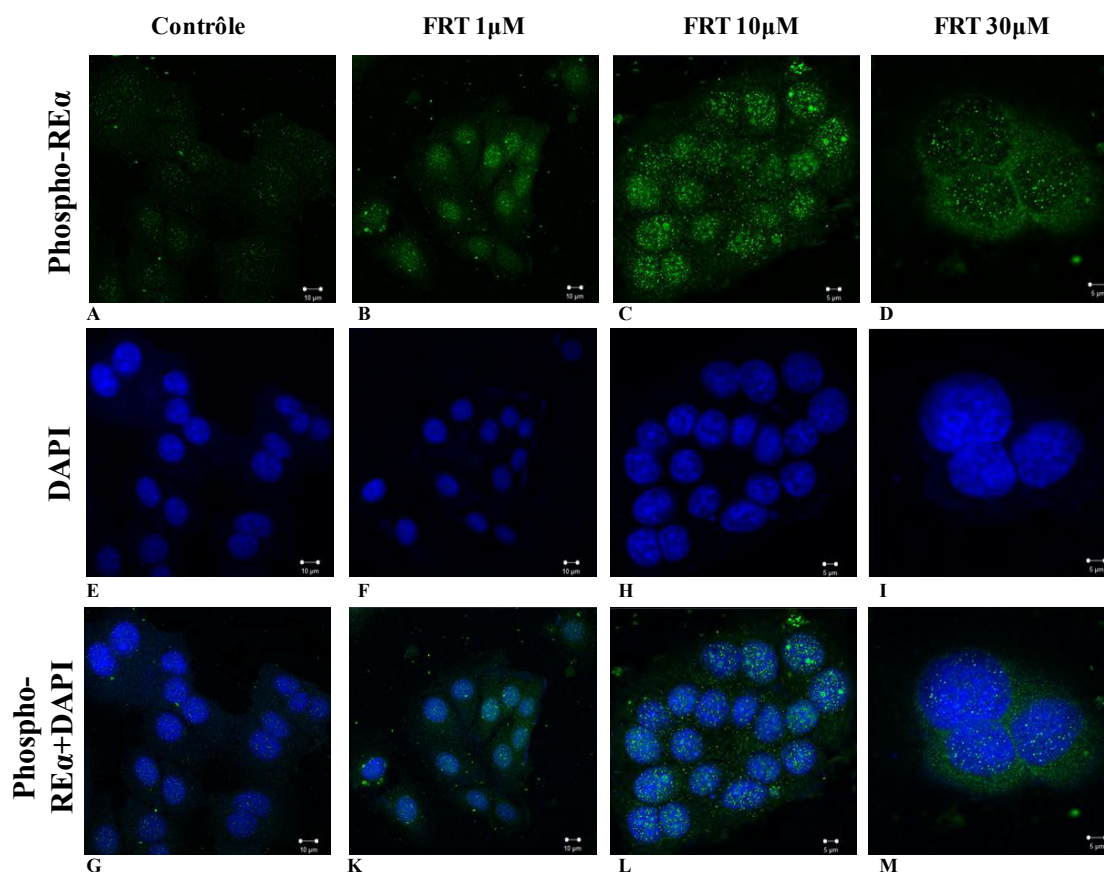


Figure 77: Marquage par immunofluorescence des cellules MCF-7. De gauche à droite : cellules contrôles dans le milieu de culture sans traitement ; cellules traitées par 1, 10 et 30 μM de férutinine pendant 1 h. (**A**→**D**) Les cellules ont été marquées par immunofluorescence avec un anticorps anti-RE α phospho-Ser 118 (AlexaFluor 488, vert). (**E**→**I**) Les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu). (**G**→**M**) Le double marquage avec le phospho RE α et le DAPI. Le marquage est visualisé par microscopie confocale. Barre d'échelle, 5 et 10 μm .

Les résultats montrent que les cellules de la lignée MCF-7 traitées par 1 μM et 10 μM de férutinine pendant 1 h, présentent un marquage plus intense des RE α phosphorylés en comparaison avec le contrôle. Cette gamme de concentrations active effectivement les RE α puisqu'ils ont subi une translocation dans le noyau (Figure 77). Cependant, à des concentrations élevées en férutinine (30 μM), l'expression de RE α phosphorylé a diminuée ainsi que leur localisation nucléaire. En effet, les récepteurs sont plus dispersés au niveau du cytoplasme, ce qui implique que leur activation a été inhibée par la férutinine.

Après 6 h de traitement (Figure 78), les résultats sont identiques à ceux observés à 1 h post-traitement.

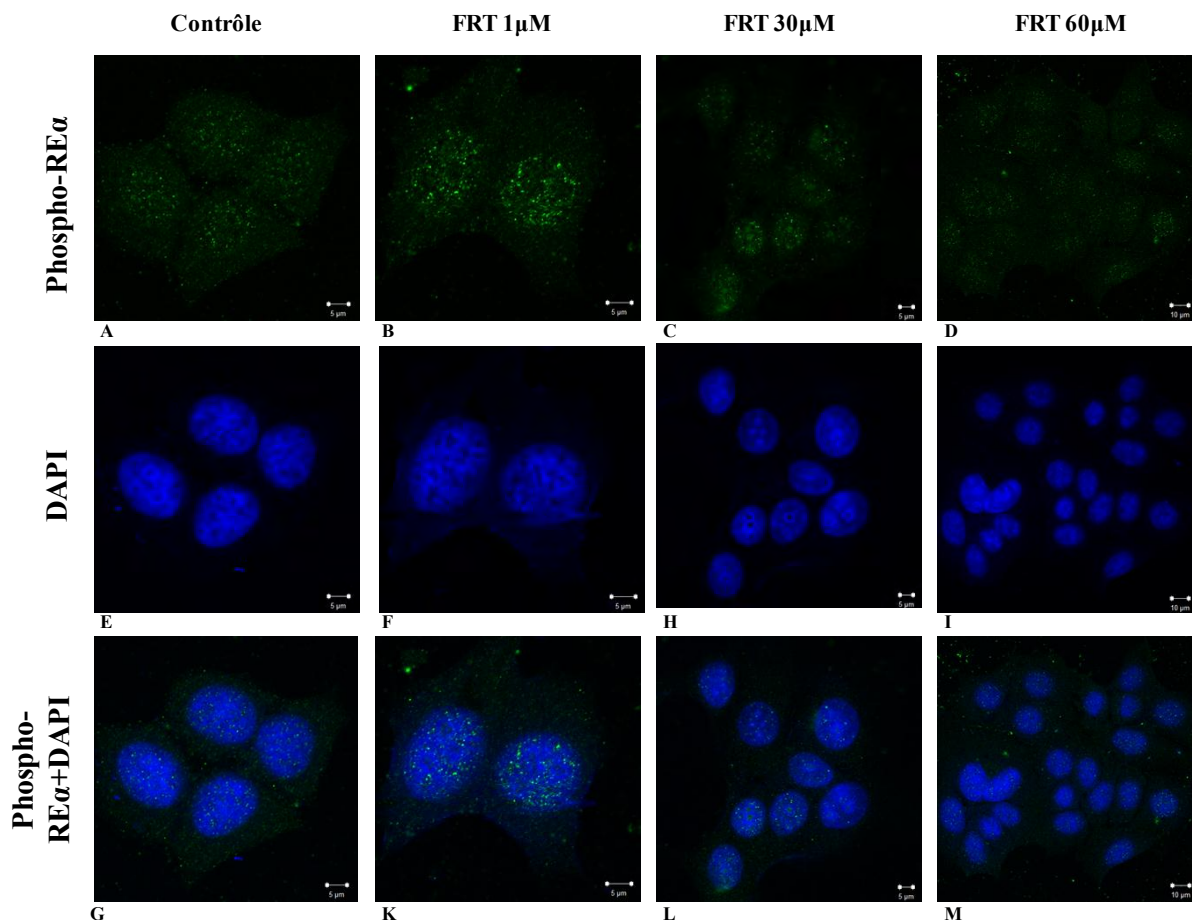


Figure 78: Marquage par immunofluorescence des cellules MCF-7. De gauche à droite : cellules contrôles dans le milieu de culture sans traitement ; cellules traitées par 1, 30 et 60 µM de la férutinine pendant 6 h. (A→D) Les cellules ont été marquées par immunofluorescence avec un anticorps anti-REα phospho-Ser 118 (AlexaFluor 488, vert). (E→I) Les noyaux ont été marqués au DAPI (bleu). (G→M) Le double marquage avec le phospho REα et le DAPI. Le marquage est visualisé par microscopie confocale. Barre d'échelle, 5 et 10 µm.

Les images de microscopie confocale indiquent la présence des REα dans le noyau des cellules MCF-7 traitées par 1 µM de férutinine puisque l'intensité de fluorescence dans ce foyer augmente. Par contre, à 30 et 60 µM, la protéine s'accumule dans le cytoplasme au profit de la fraction nucléaire. Le marquage dans ce cas est moins intense et diffus ce qui montre une diminution de la proportion des récepteurs activés.

L'immunofluorescence est une méthode plus sensible que l'immunoblotting. Elle constitue un argument supplémentaire pour confirmer la voie de signalisation de la férutinine à basse concentration qui passe par la translocation nucléaire des REs. Ceci témoigne que les effets prolifératifs observés chez la lignée œstrogéno-dépendante sont due à l'activation des REα.

Le test du fractionnement de chaque compartiment de la cellule (membrane, cytoplasme et noyau) permettra de renforcer cette hypothèse. Par l'intermédiaire de ce test, le statut spatial et temporel des récepteurs sera élucidé. Le fractionnement cellulaire permettra donc de tracer et de quantifier la variation de l'expression et le transit des REs lors de leur translocation dans le noyau.

L'effet antiprolifératif de la férutinine a été validé par l'apoptose, et son effet prolifératif pourrait être expliqué par l'activation du RE α . La férutinine active donc deux mécanismes différents : l'apoptose à haute concentration (effet antiprolifératif) et les REs à basse concentration (effet prolifératif). Le tamoxifène lui aussi agit selon deux mécanismes : il active les REs à des concentrations de l'ordre du nano-molaire, alors qu'à des concentrations de l'ordre du micro-molaire il agit sur plusieurs cibles de la voie de signalisation comme la PKC (*phospho kinase C*) et la calmoduline (Medina P *et al.*, 2004). Notre étude ne rentre pas dans le cadre d'une investigation complète dévoilant les voies de signalisation de la férutinine mais s'inscrit plutôt dans une démarche explicative des effets observés *in vitro* sur les cellules cancéreuses du sein. A ce niveau, les analyses de l'expression des récepteurs ont apporté en partie un complément pour la compréhension des événements stimulés par la férutinine chez la lignée cellulaire MCF-7.

Une meilleure compréhension des résultats devrait s'accompagner de l'analyse de l'expression des REs non phosphorylés et donc inactifs, suivie par une comparaison du niveau d'expression des phospho-REs/REs, ce qui donnera une idée plus réaliste des événements. Il est important de signaler que le site de la phosphorylation joue un rôle important dans l'identification de la fonction de la protéine. Le domaine N-terminal comportant la partie AF-1 du récepteur est la cible de plusieurs phosphorylations fonctionnelles, parmi lesquelles, la phospho Ser-104/106, Ser-167 et Ser-118. Cette dernière, activée par la férutinine, est sous la régulation de la kinase MAPK (Yamnik RL et Holz MK, 2010). Pour confirmer le passage par cette voie, une étude protéomique pourrait donner les justifications nécessaires sur la(les) voie(s) stimulée(s) par la férutinine.

Dans certains cas, la résistance aux thérapies hormonales peut être due aux phosphorylations. En effet, bien que l'activité du récepteur des œstrogènes soit classiquement liée à la fixation de son ligand, de nombreux facteurs de croissance peuvent stimuler son activité en absence de ligand. Les facteurs de croissance stimulent ainsi l'activité du récepteur des œstrogènes par des phosphorylations. Une des voies qui pourrait avoir un rôle important dans la régulation de l'activité du récepteur des œstrogènes est la voie de la kinase PI3K. Une des cibles de la PI3K peut être la sérine/thréonine protéine kinase AKT (ou PKB) dont

l'activation est responsable de la prolifération cellulaire et de l'inhibition de l'apoptose. La protéine AKT active le récepteur des œstrogènes par la phosphorylation de la sérine 167. L'activation du récepteur devient alors indépendante des ligands (Campbell RA *et al.*, 2001).

Pour une vue plus généralisée, des études plus poussées au niveau moléculaire sont nécessaires pour dévoiler les voies de signalisations activées par la férutinine. La mise en évidence du rôle de chacun des déterminants de la liaison, permettra une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à l'obtention de nouvelles molécules anticancéreuses plus spécifiques.

Dans des études hormonales semblables, le problème réside dans la présence de plusieurs isoformes d'un même récepteur, possédant dans la plupart des cas plusieurs fonctions. Par exemple, l'épissage alternatif de l'ARNm du récepteur des œstrogènes induit l'absence d'exons spécifiques. Les ARN ainsi formés codent pour des récepteurs aux œstrogènes tronqués et constitutivement actifs. Ce mécanisme peut être un des mécanismes de résistance aux thérapies hormonales. Au niveau protéique, l'épissage alternatif conduit à la présence de plusieurs variants de RE de tailles différents. A titre d'exemple, le RE α possède au moins trois isoformes dans la lignée MCF-7, ce sont le RE α 66 (66 KDa), le RE α 46 (46 KDa) et le RE α 36 (36 KDa). L'isoforme recherchée dans cette étude est le RE α 66 qui est présent dans le compartiment péri-nucléaire suite à sa liaison au ligand (Reyhaan A et Chaudhi R, 2012). D'autre part, le RE β 1 codant pour 530 acides aminés est l'isoforme la plus répandue chez les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 (Fuqua SAW *et al.*, 1999).

La maîtrise de ces variantes reste loin d'être applicable surtout au niveau de cette étude.

IV.5 La férutinine inhibe la formation des cellules souches/progénitrices dans les lignées MDA-MB-231 et MCF-7

Les résistances aux thérapies hormonales peuvent résulter de la présence des cellules souches cancéreuses qui activent des voies mitogènes indépendantes des hormones. En effet, les chimiothérapies conventionnelles tuent les cellules différenciées ou en différenciation, qui forment la majeure partie de la tumeur, mais qui sont incapables de produire de nouvelles cellules. Une population de CSC, qui lui a donné naissance, pourrait rester intacte et provoquer une rechute de la maladie. Des recherches ciblant ces CSCs en vue d'obtenir de nouveaux agents anti-tumoraux commence à se développer et ont débouché sur des molécules anti-tumorales comme le composé MK-0752 qui est en phase clinique I/ II pour le traitement

de cancers réfractaires aux thérapies conventionnelles (Krop I *et al.*, 2012). Dans cette optique, il nous a paru intéressant de regarder si la férutinine pouvait avoir une action sur ces CSCs. Les cellules souches cancéreuses, qui échappent aux traitements actuels, constituent une cible privilégiée dans la lutte contre les récives. Cibler spécifiquement ces CSC permettrait d'améliorer la prise en charge des cancers.

Une culture tridimensionnelle (sphères) sur support non adhérent est l'une des caractéristiques des cellules souches/progénitrices. En présence de matrigel, des structures sphéroïdes d'origine clonale peuvent être formées. Les sphères peuvent être repiquées plusieurs fois permettant ainsi de quantifier le potentiel oncogénique et d'autorenouvellement des cellules souches cancéreuses. Le matrigel confère aux cellules un environnement similaire à la matrice extracellulaire surtout en ce qui concerne sa composition protéique (collagène, laminine, entactine et héparane sulfate).

Pour former des sphères, les cellules MCF-7 ont été cultivées pendant 10 jours alors que les cellules MDA-MB-231 pendant 8 jours avec un renouvellement du milieu de culture tous les deux jours.

Pour dénombrer les sphères et pour connaître leur taille, le logiciel « *Zen light* » a été utilisé. Pour estimer le pourcentage de cellules clonogéniques, c'est-à-dire apte à former des sphères, le nombre des sphères a été rapporté au nombre des cellulesensemencées sphères et a été calculé par l'évaluation de l'unité de formation des sphères (UFS).

Tous les 8 ou 10 jours, afin d'évaluer le potentiel clonogénique à long terme de chaque population, les sphères ont été dissociées avec de la trypsine puis les cellules ont été réensemencées dans du matrigel.

Ce test tridimensionnel est utilisé afin d'évaluer la capacité de la férutinine à cibler les cellules souches/progénitrices cancéreuses. L'analyse fonctionnelle des populations souches/progénitrices montre qu'en absence du traitement, l'UFS est de 10 % pour les cellules MCF-7 et de 19 % pour les cellules MDA-MB-231. Par contre, le traitement des cellules MCF-7 par la férutinine n'a aucun effet à 3 μ M tandis que l'UFS est réduite de 40 % et de 99 % pour un traitement de 10 μ M et 30 μ M respectivement. D'autre part, une diminution progressive de l'UFS de 65 % à 10 μ M puis de 100 % à 30 μ M en férutinine est observée dans le cas des cellules dérivées de la lignée MDA-MB-231 (Figure 79).

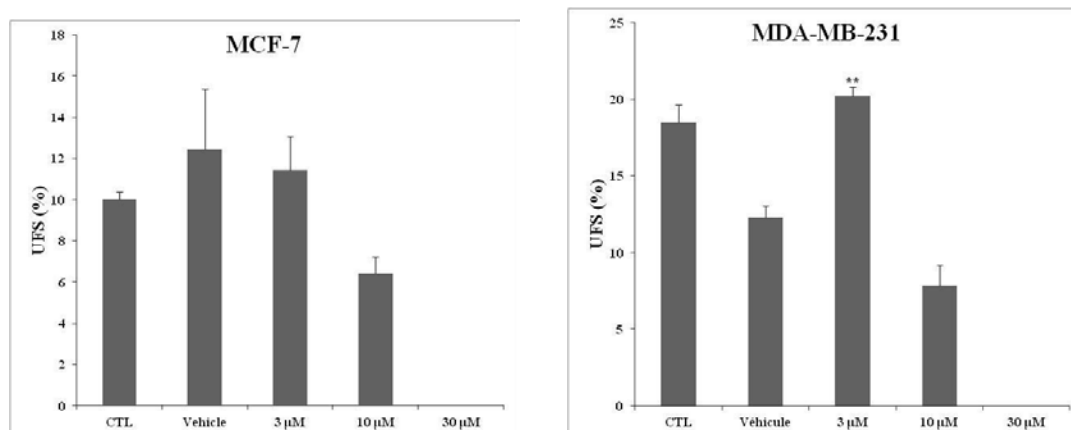


Figure 79 : Unité de formation des sphères des cellules dérivées de la lignée MCF-7 et MDA-MB-231 exprimée en pourcentage de l'UFS. Les sphères ont été traitées par la férutinine pendant 10 (MCF-7) et 8 (MDA-MB-231) jours. Chaque expérience a été réalisée en duplicata. ** indique une différence significative par rapport au véhicule avec $p < 0,01$ (test de Student).

En ce qui concerne la forme et la taille des sphères, la lignée MCF-7 présente des sphères bien arrondies alors que la lignée MDA-MB-231 possède des sphères dispersées. C'est pour cette raison que l'évaluation de la taille des sphères a été réalisée en mesurant sa surface et non pas son diamètre dans le cas de la lignée cellulaire MDA-MB-231. Les tailles des sphères des cellules MCF-7 sans et avec traitement par la férutinine à 3, 10 et 30 µM sont représentées sur la Figure 80. Les tailles des sphères ne varient pas avec le traitement par la férutinine à 3 et 10 µM et deviennent nulles à 30 µM après 10 jours de culture (Figure 80).

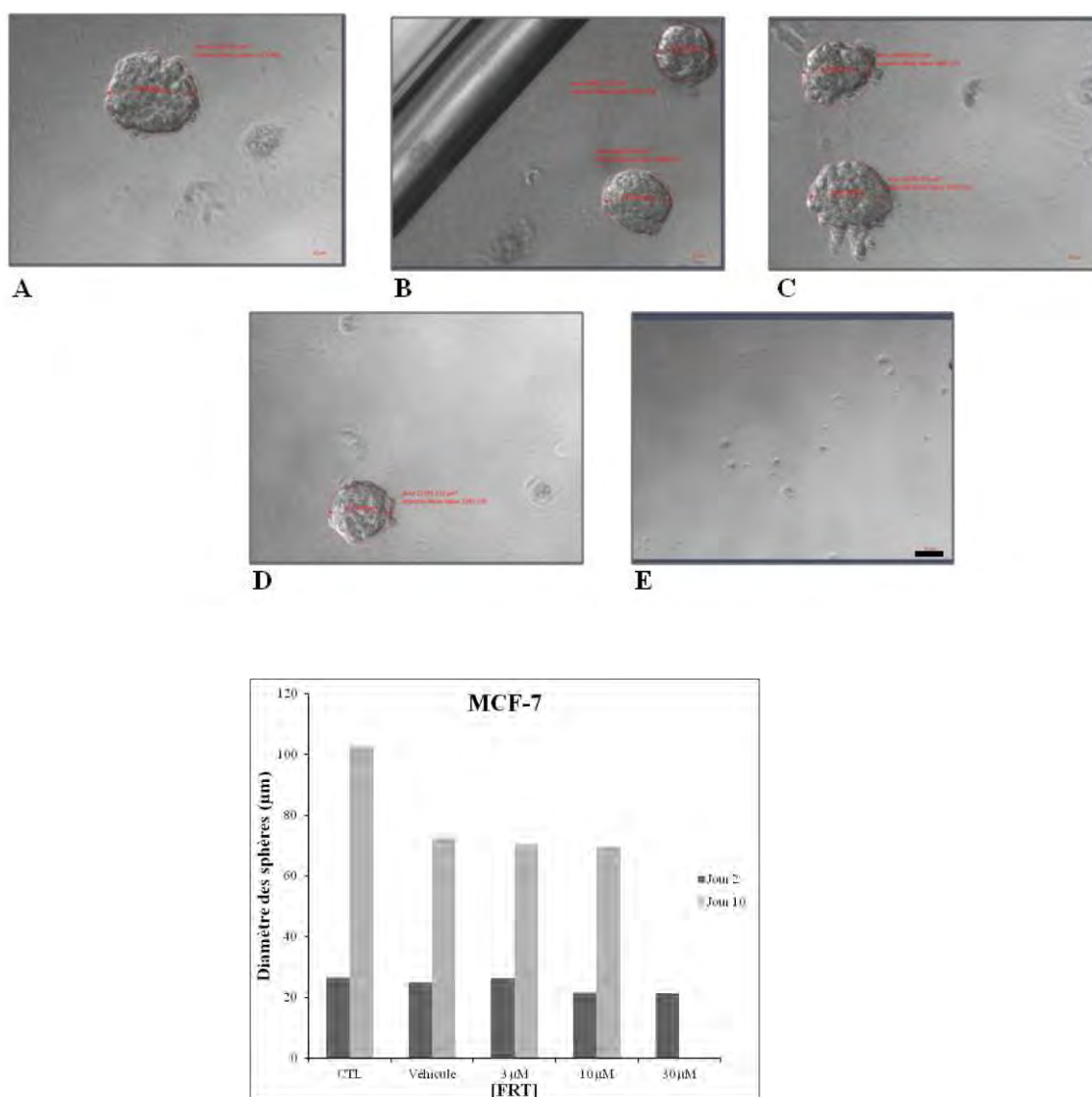


Figure 80 : Taille des sphères des cellules cancéreuses dérivées de la lignée MCF-7 après 2 et 10 jours, de traitement par la férutinine. (A) CTL, sans traitement ; (B) Véhicule, traitement par DMSO ; (C) FRT 3 μM ; (D) FRT 10 μM ; (E) FRT 30 μM. L'histogramme représente le diamètre des sphères en fonction de la concentration de la FRT. Les photos sont prises sous microscope optique. Barre d'échelle, 50 μm.

Les tailles des sphères des cellules MDA-MB-231 sans et avec traitement par férutinine à 3, 10 et 30 μM, sont montrées dans la Figure 81. Dans le cas des sphères dérivées de la lignée MDA-MB-231, la surface des sphères contrôles est de (5000 μm²). Une augmentation de 5 fois (25000 μm²) et de 3 fois (15000 μm²) a été observée après traitement par 3 μM par 10 μM de férutinine, respectivement (Figure 81).

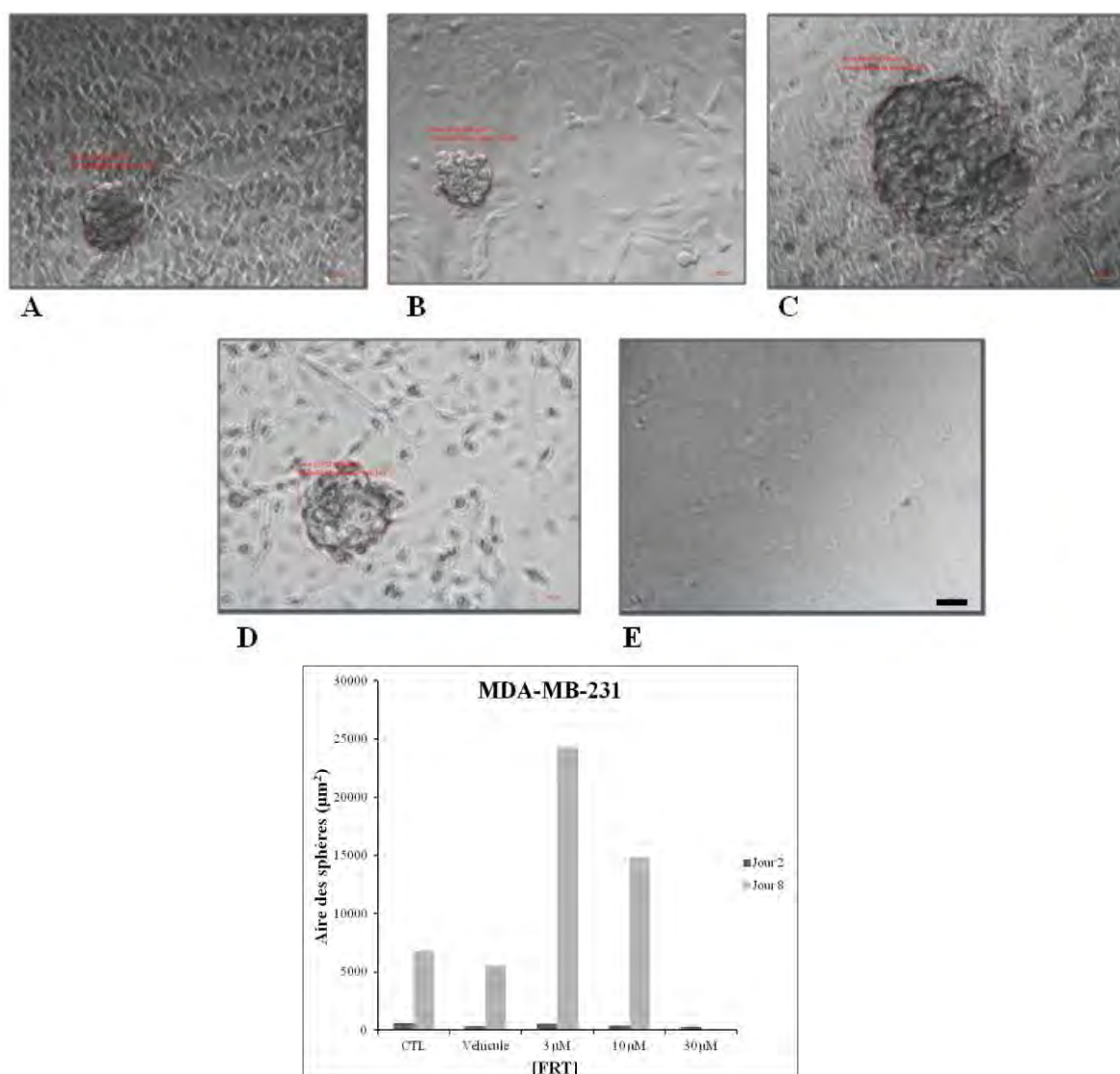


Figure 81 : Surface des sphères dérivées de la lignée cellulaire MDA-MB-231 après 2 et 10 jours de traitement par la férutinine. (A) CTL, sans traitement ; (B) Véhicule, traitement par DMSO ; (C) FRT 3 μ M ; (D) FRT 10 μ M ; (E) FRT 30 μ M. L'histogramme représente la surface des sphères en fonction de la concentration de FRT. Les photos sont prises sous microscope optique. Barre d'échelle, 50 μ m.

Afin d'étudier l'effet de la férutinine sur l'inhibition ou l'enrichissement des sphères en cellules souches/progénitrices, une caractérisation de la population des CSC a été évaluée grâce à la recherche des marqueurs spécifiques CD24 et CD44. Le phénotype CD44^{fort}/CD24^{faible} est le plus fréquent dans le cancer du sein. Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 ont été traitées pendant 24 h, 48 h et 72 h avec différentes concentrations de férutinine (10, 30 et 60 μ M), incubées en présence des anticorps anti-CD24 et anti-CD44 puis analysées par la cytométrie de flux (Figure 82).

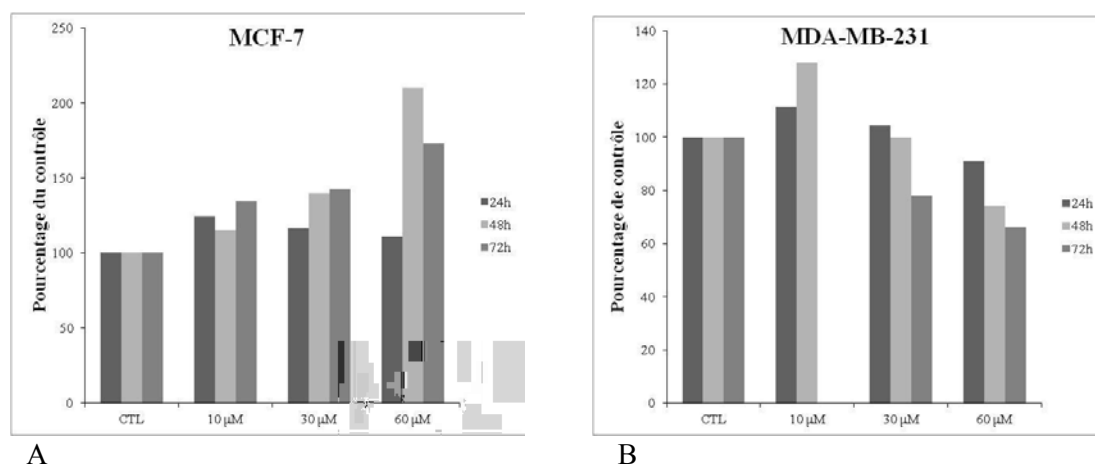


Figure 82 : Variation de la population $CD44^{fort}/CD24^{faible}$ exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine. Les deux lignées cellulaires ont été traitées par la férutinine (10, 30 et 60 μM) pendant 24 h, 48 h et 72 h. Les cellules ont été marquées par les anticorps anti-CD44 et anti-24 puis analysées par la cryométrie de flux. (A) Valeurs de $CD44^{haut}/CD24^{bas}$ chez la lignée MCF-7 ; (B) Valeurs de $CD44^{fort}/CD24^{faible}$ chez la lignée MDA-MB-231. L'expérience a été faite 1 fois, $n=1$.

Les résultats ont montré qu'après 24 h de traitement, aucune variation phénotypique n'a été observée dans la lignée MCF-7. Par contre, après 72 h de traitement, la population des CSC était enrichie de 34 %, 42 % et de 73 % avec un traitement par la férutinine de 10, 30 et 60 μM , respectivement. En revanche, dans le cas de la lignée MDA-MB-231, les CSC ont été réduits de 10 % après 24 h de traitement par 60 μM de férutinine. Après 72 h de traitement, la population $CD44^{fort}/CD24^{faible}$ a été diminuée de 25 % par 30 μM et de 37 % par 60 μM de férutinine.

Afin de quantifier le potentiel clonogénique et d'autorenouvellement des cellules cancéreuses, les sphères formées ont été repiquées plusieurs fois et remises en culture. Dans ce but, le 10^{ème} jour et le 8^{ème} jour, dans le cas des lignées MCF-7 et MDA-MB-231 respectivement, ont été considérés des jours de propagations. Lors de chaque étape d'expansion, les cellules ont été divisées en contrôle (condition non traitée) et en traitées par les différentes concentrations de férutinine (le traitement est cumulatif). Le schéma général de la propagation de MCF-7 est illustré dans la Figure 83.

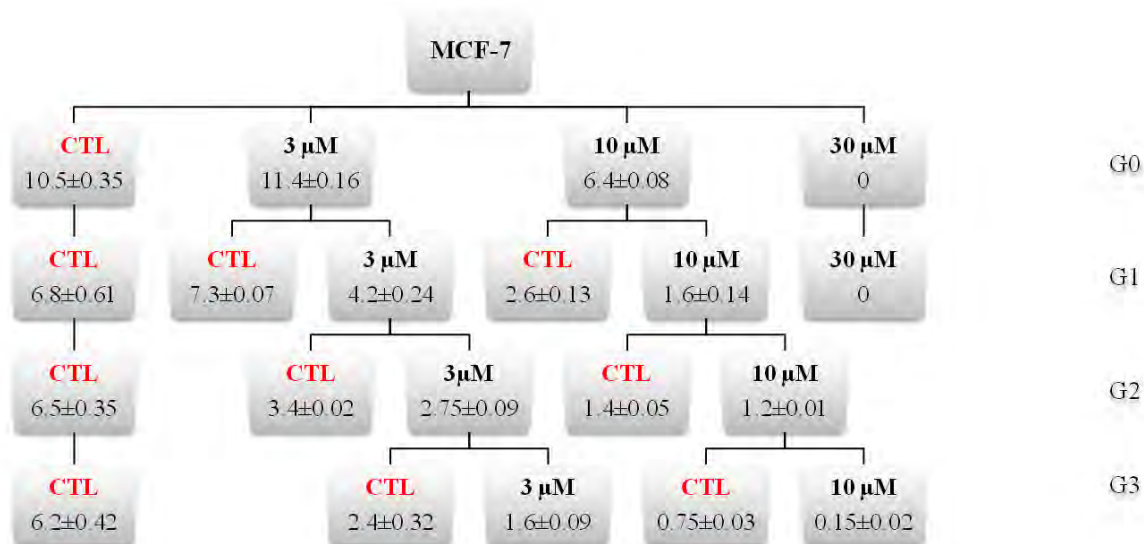


Figure 83 : Schéma de la propagation des cellules MCF-7. Les valeurs de l'UFS figurent à chaque étape. Chaque propagation est menée après 10 jours de culture, notée générations G0 à G3. Au niveau de chaque génération, les puits traités par la FRT sont divisés en puits CTL et puits traités d'une façon cumulative avec la férutinine.

Les résultats montrent que 30 µM de férutinine est capable d'inhiber complètement la formation des sphères dérivées de la lignée MCF-7 dès la première génération (G1). Cette concentration d'inhibition correspond à la valeur du CI_{50} de la férutinine en culture 2D. De plus, un effet dose dépendant sur la formation des sphères est observé avec un traitement par la férutinine à des concentrations situées entre 3 et 10 µM. Au bout de la troisième génération (G3), une concentration de 10 µM de férutinine induit l'inhibition de la formation des sphères (UFS= 0,15±0,02 par rapport à 0,75±0,03 obtenu pour le contrôle de cette même concentration), alors qu'une diminution de moitié des sphères a été observé avec une concentration de 3 µM (UFS= 1,6±0,09 par rapport au contrôle UFS= 2,4±0,32). La présence des sphères dans le contrôle de la troisième génération suggère un enrichissement en CS induit par une concentration de 3 µM de férutinine.

En ce qui concerne la propagation des sphères dérivées de la lignée MDA-MB-231, le schéma général est illustré dans la Figure 84.

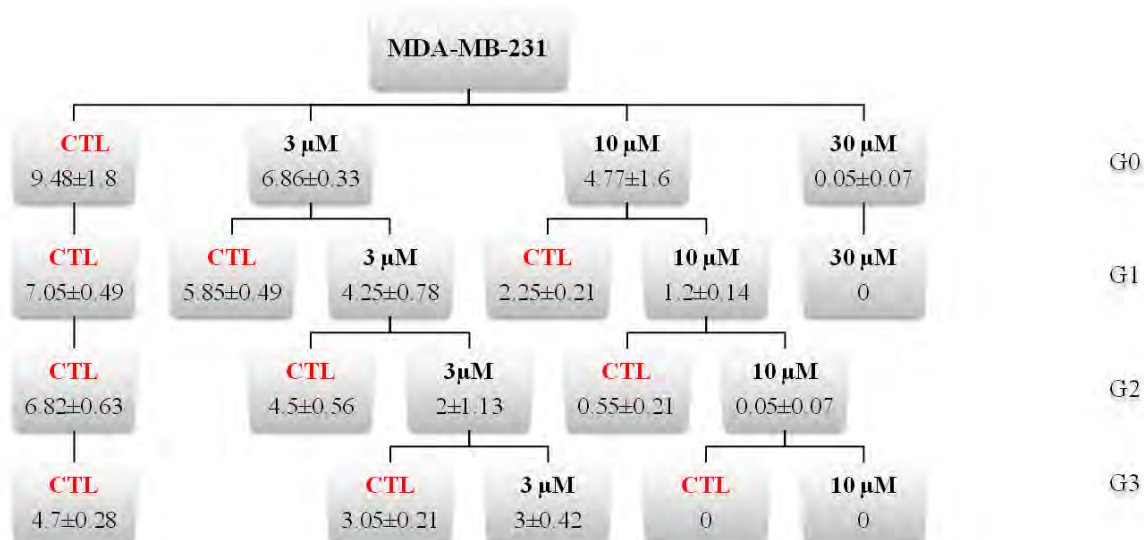


Figure 84 : Schéma de la propagation des cellules MDA-MB-231. Les valeurs de l'UFS figurent à chaque étape. Chaque propagation est menée après 8 jours de culture, notée générations G0 à G3. Au niveau de chaque génération, les puits traités par FRT sont divisés en puits CTL et puits traités d'une façon cumulative avec la férutinine.

Une concentration de 30 µM et de 10 µM de férutinine est capable d'inhiber la formation des sphères dérivées de la lignée MDA-MB-231 à la première génération et à la troisième génération (UFS = 0) respectivement. Tandis qu'à une concentration de 3 µM, la férutinine n'a aucun effet sur les CSCs (UFS = 3±0,42 par rapport au contrôle UFS= 3,05±0,21) (Figure 84). Afin de confirmer l'effet de la férutinine sur la formation des sphères dérivées de la lignée MCF-7, les cellules cancéreuses ont été prétraitées par la férutinine pour 48 h et 72 h, puis les sphères ont été générées pour trois générations (Figure 85). A chaque étape, des cellules ont été divisées en contrôle et en traitées avec des concentrations cumulatives en férutinine.

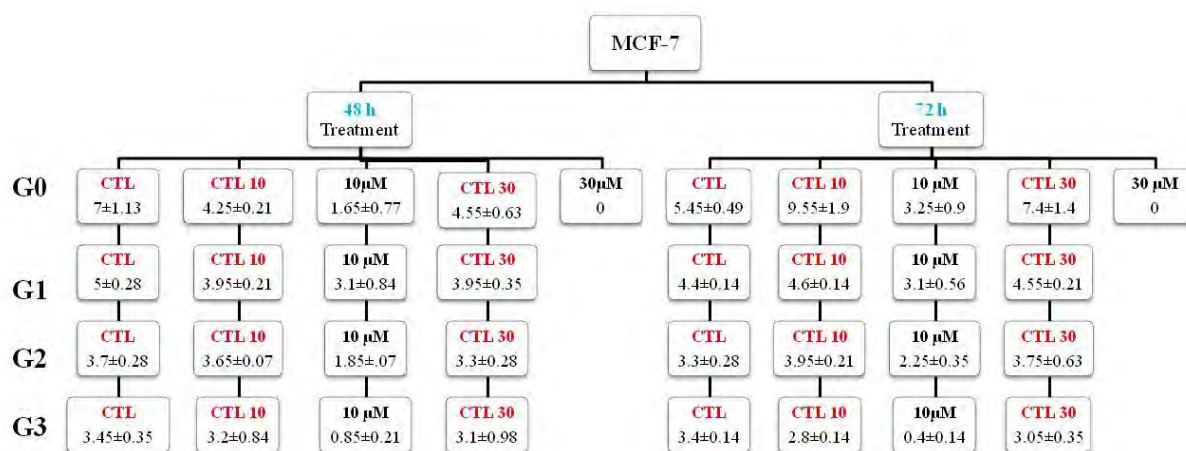


Figure 85 : Schéma de la propagation des cellules MCF-7 suite à un prétraitement par la férutinine pour 48 h et 72 h. Les valeurs de l'UFS figurent à chaque étape. Chaque propagation est menée après 10 jours de culture, notée générations G0 à G3. Au niveau de chaque génération, les puits traités par la FRT sont divisés en puits CTL et puits traités d'une façon cumulative.

Le prétraitement des cellules cancéreuses MCF-7 avec une concentration de 30 μM de férutinine pour 48 h ou 72 h inhibe complètement la formation des sphères avant même la première propagation. Alors qu'un prétraitement avec une concentration de 10 μM de férutinine et la maintenance de ce traitement durant toutes les propagations induit une inhibition de la formation des sphères au bout de la G3 : UFS= $0,85 \pm 0,21$ prétraitement 48 h et UFS= $0,4 \pm 0,14$ prétraitement 72 h. En revanche, le prétraitement par 10 ou 30 μM de férutinine pour 48 h ou 72 h induit la formation des sphères lorsque le traitement est arrêté pendant l'expansion des générations (conditions contrôles de G0 à G3).

Ces résultats suggèrent une augmentation du potentiel clonogénique et d'autorenouvellement des cellules cancéreuses suite au prétraitement 72 h par la férutinine à 10 et 30 μM .

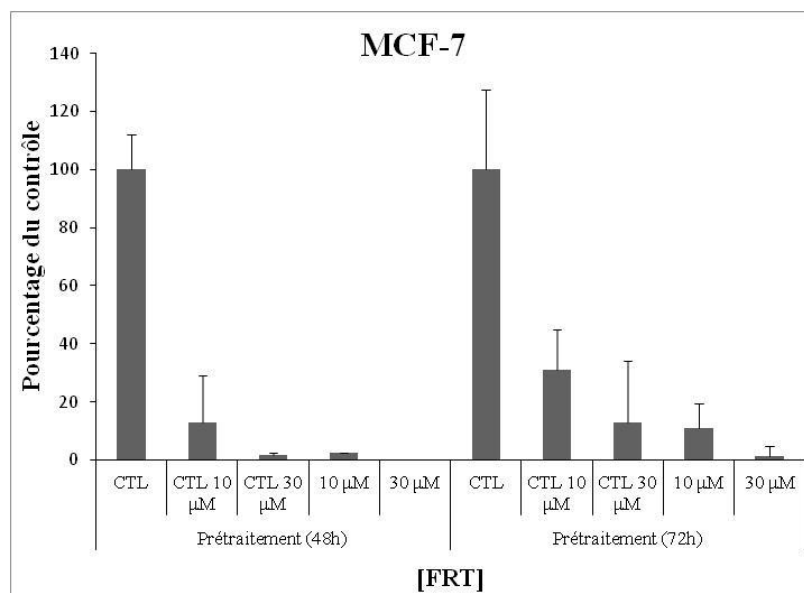


Figure 86: Nombre de sphères des cellules MCF-7 de la première génération suite au prétraitement par la férutinine. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle, moyenne de deux puits.

En ce qui concerne la lignée MDA-MB-231, une concentration de 30 μM de férutinine était capable d'inhiber complètement la formation des sphères au niveau de la génération G0 alors qu'à une concentration de 10 μM l'inhibition est observée au bout de la troisième génération (Figure 87).

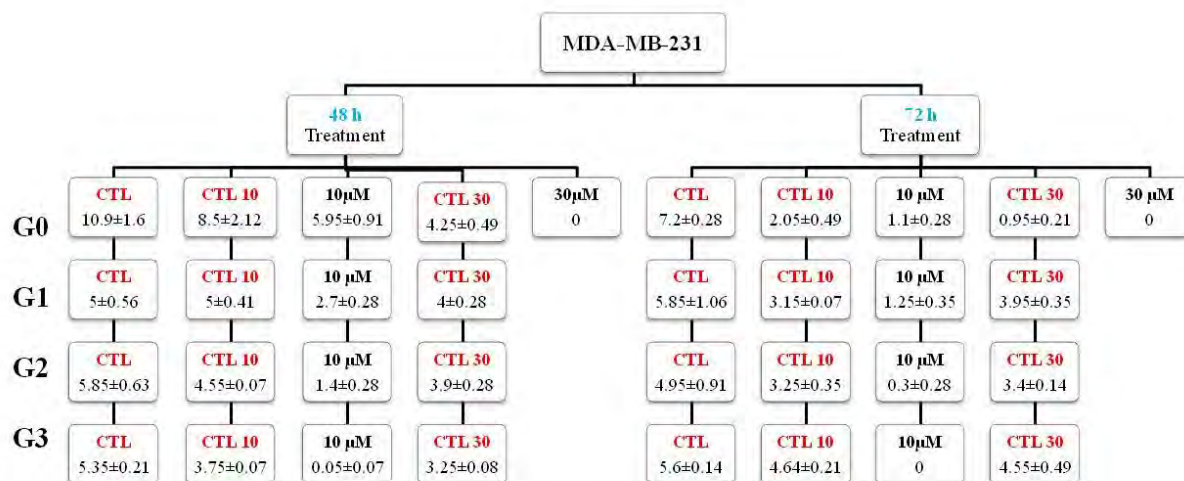


Figure 87 : Schéma de la propagation des cellules MDA-MB-231 suite à un prétraitement par la férutinine pour 48 h et 72 h. Les valeurs de l'UFS figurent à chaque étape. Chaque propagation est menée après 8 jours de culture, notée générations G0 à G3. Au niveau de chaque génération, les puits traités par la FRT sont divisés en puits CTL et puits traités d'une façon cumulative avec la férutinine.

Une augmentation du potentiel clonogénique et d'autorenouvellement des cellules cancéreuses est observée au niveau de la lignée MDA-MB-231. Ceci est bien détecté dans le contrôle 30 µM où l'UFS est de 3,25±0,08 et de 4,55±0,49 au bout de la génération G3 après 48 h et 72 h de traitement, respectivement.

La Figure 88 montre le nombre de sphères dérivées de la lignée MDA-MB-231 de la première génération suite au prétraitement par la férutinine durant 48 et 72 h.

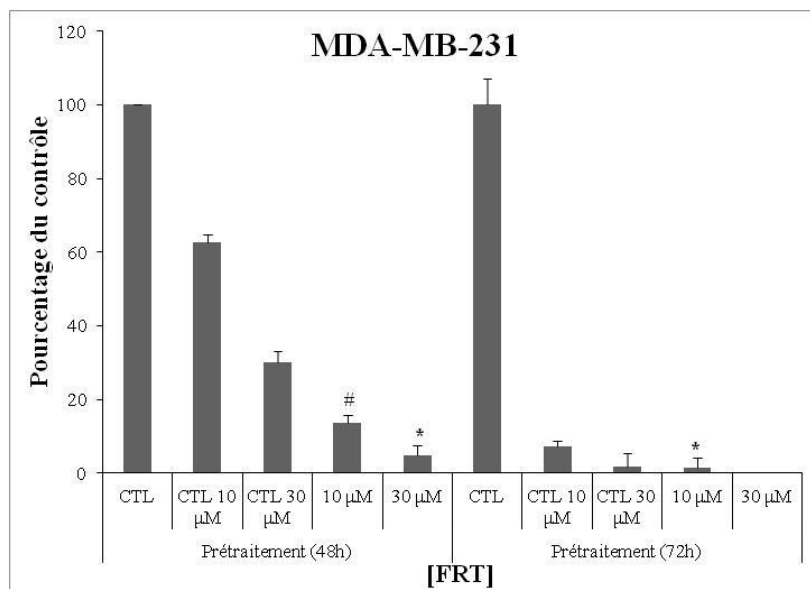


Figure 88 : Nombre de sphères des cellules MDA-MB-231 de la première génération suite au prétraitement par la férutinine. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle, moyenne de deux puits. * ; ** et # indiquent une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,005$ respectivement (test de Student).

Les résultats présentés dans la Figure 88 suggèrent que la férutinine cible les CSC de la lignée MDA-MB-231. Le profil triple négatif et le mauvais pronostic de cette lignée rend ce résultat très intéressant. D'autre part, la férutinine contribue à l'enrichissement de la population des CSC de la lignée MCF-7 à des basses concentrations. Un résultat similaire a été observé quant au traitement de ces cellules avec le tamoxifène (Hiscox S *et al*, 2012).

La férutinine cible les CSC du sein sans être capable d'inhiber complètement la capacité d'autorenouvellement de cette population. Ceci peut être expliqué par la présence d'une sous population résiduelle des CSC, probablement plus agressive, capable d'induire des tumeurs plus résistantes.

Des analogues de la férutinine n'ayant pas l'effet biphasique pourront être alors intéressants pour le développement de nouvelles stratégies dans la prévention de la résistance dans le cas des lignées cancéreuses du sein.

IV.6 La férutinine est légèrement sélective vis-à-vis des lignées cellulaires cancéreuses

L'inconvénient majeur des médicaments anticancéreux réside dans leur sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses. La sélectivité de la férutinine vis-à-vis de la lignée cellulaire cancéreuse a été examinée sur une lignée cellulaire normale immortalisée du sein MCF-10A (contrôle), et sur une lignée primaire de cellules endothéliales aortiques humaines, HAEC.

La MCF-10A œstrogéno-sensible, présente l'avantage d'être facilement cultivée dans un milieu de culture en présence d'additifs de croissance. L'effet antiprolifératif de la férutinine est observé 24 h après traitement avec 30 % d'inhibition à 75 μ M. Cet effet s'accroît progressivement pour arriver à 90 % d'inhibition après 72 h. La valeur de CI_{50} est de 50 μ M (72 h post-traitement), elle révèle une légère sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses MCF-7 (Figure 89).

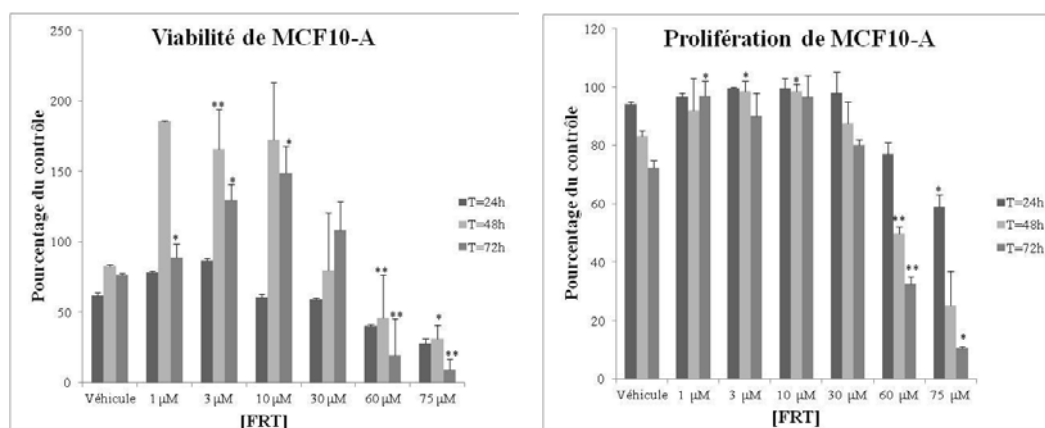


Figure 89 : Viabilité (à gauche) et prolifération (à droite) cellulaire de la lignée MCF-10A exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après 24 h, 48 h et 72 h. Le traitement a été effectué après 24 h d'ensemencement des cellules à raison de 3000 cellules/puits dans une plaque de 96 puits. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 595 nm. Chaque expérience a été réalisée en triplicata. * et ** indiquent une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test de Student).

De même, l'effet de la férutinine a été testé sur la prolifération des cellules endothéliales aortique humaine, HAEC (Figure 90). Cette lignée primaire est cultivée dans un milieu de culture supplémenté de facteurs de croissance et elle est utilisée dans cette étude pour un nombre de passage inférieur à 6.

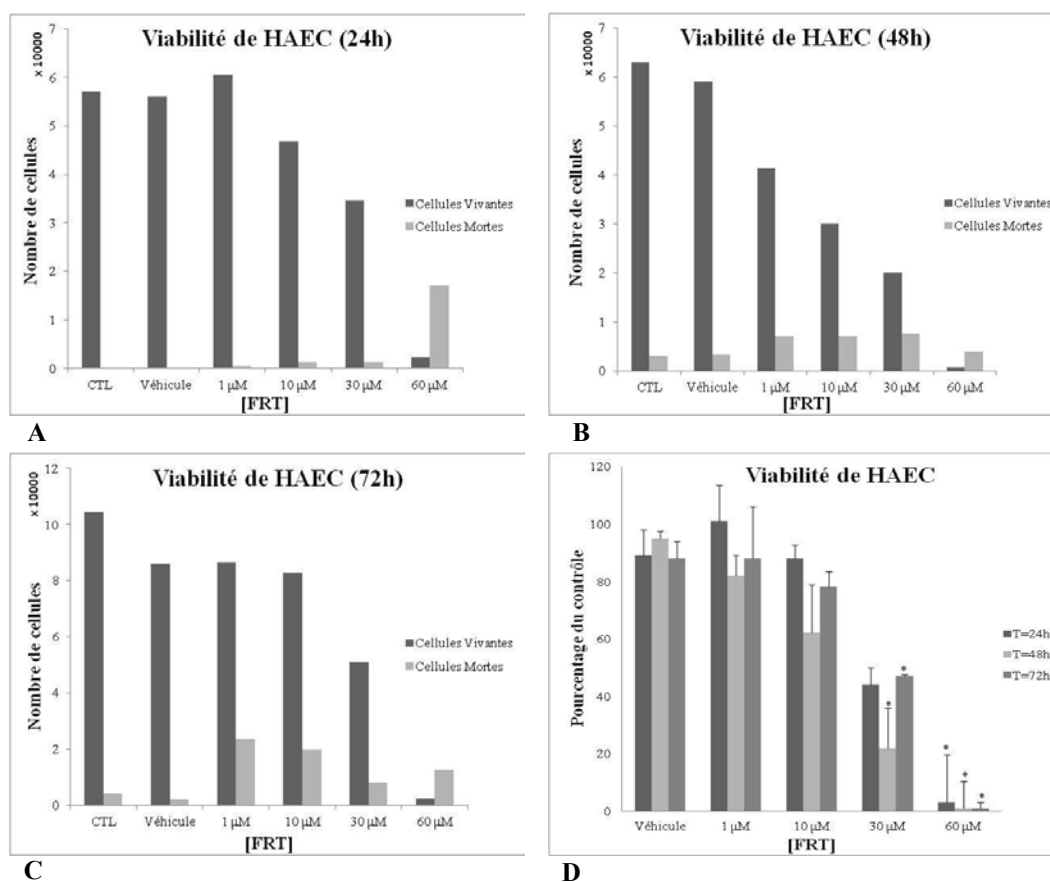


Figure 90 : Viabilité cellulaire de la lignée HAEC suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après (A) 24 h, (B) 48 h et (C) 72 h (A, B et C sont les résultats d'expériences représentatives). (D) Comparaison du pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au contrôle en fonction de la dose et du temps. Le traitement a été effectué après 24 h d'ensemencement des cellules à raison de 25 000 cellules/puits dans une plaque de 24 puits. Le comptage des cellules a été fait avec le bleu de Trypan en utilisant l'hemocytomètre. Chaque expérience a été réalisée en duplicat. * indique une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$ (test de Student).

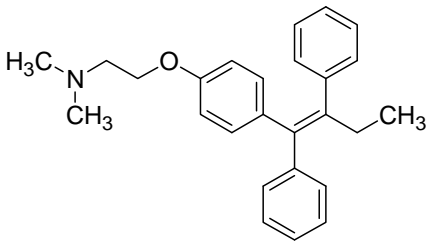
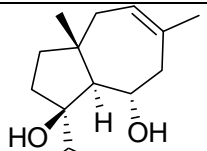
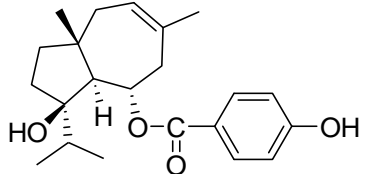
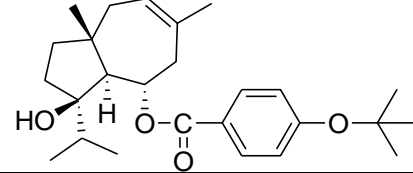
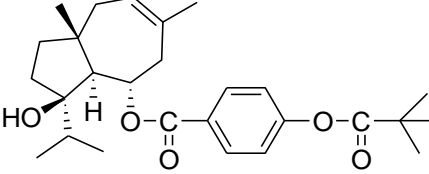
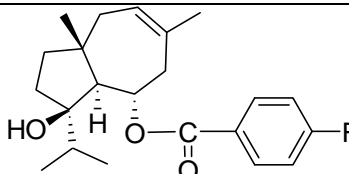
Les résultats obtenus montrent que la férutinine est cytotoxique sur les cellules cancéreuses comme sur les cellules normales. Son effet a été observé 24 h après traitement avec 50 % d'inhibition à 30 μ M. La valeur de CI_{50} est très proche de celle obtenue chez les cellules MCF-7 (CI_{50} = 38 μ M) et MDA-MB-231 (CI_{50} = 28 μ M) 72 h post-traitement. Même si la férutinine est relativement sélective sur MCF-10A, elle reste cytotoxique au niveau des cellules normales non mammaires, ce qui limite l'intérêt de procéder dans l'étude de son effet *in vivo*.

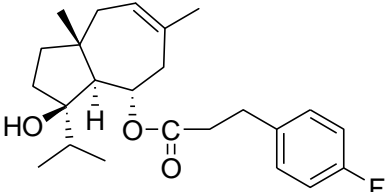
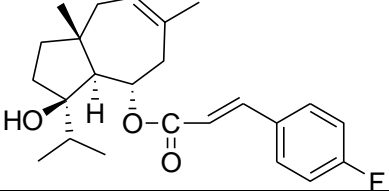
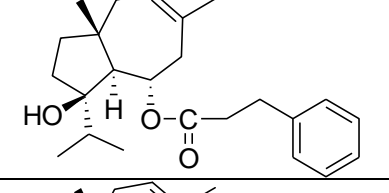
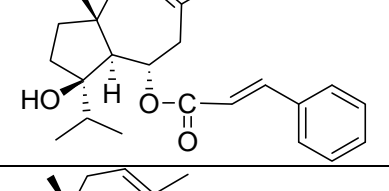
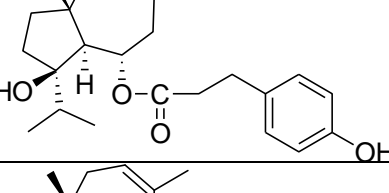
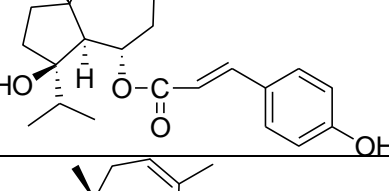
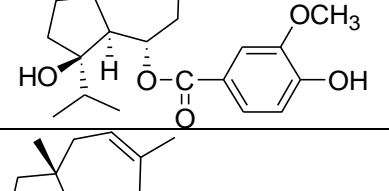
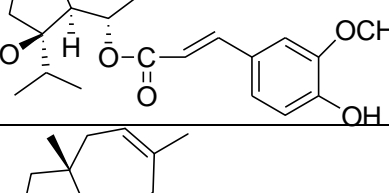
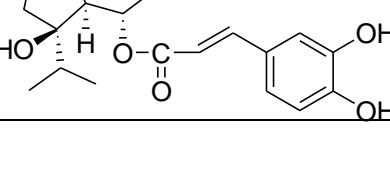
IV.7 Les analogues 3c' et 2c' sont des candidats potentiels dans traitement du cancer du sein

Les analogues de la férutinine synthétisées et caractérisées ont été testés pour leurs activités cytotoxiques vis-à-vis des deux lignées cancéreuses du sein à l'aide du test MTT.

Parmi les esters analogues de la férutinine, le composé **3c'** et le composé **2c'** ont montré une activité intéressante vis-à-vis les lignées œstrogéno-dépendantes et indépendantes, respectivement. Le composé **3c'** possède une CI_{50} de 1 μM vis-à-vis de la lignée cellulaire MCF-7 dépendante de l'œstrogène. D'autre part, le composé **2c'** est le plus actif vis-à-vis de la lignée œstrogéno-indépendante MDA-MB-231 avec une CI_{50} de 9 μM . En revanche, les autres analogues sont totalement ou partiellement inactifs (Tableau 34).

Tableau 34 : Valeurs de CI_{50} des analogues hémi-synthétiques sur les lignées cellulaires cancéreuses du sein (MCF-7 et MDA-MB-231), sur la lignée contrôle du sein (MCF-10A) et sur la lignée normale aortique endothéliale (HAEC). Les résultats représentent la moyenne de trois expériences différentes par le test MTT.

Produits	Structures	Lignées cellulaires CI_{50} (μM)			
		MCF-7	MDA-MB-231	MCF-10A	HAEC
Tamoxifène		10	-	-	-
Jaeschkenadiol		>50	>50	-	-
Férutinine		38	28	50	30
1a		>50	>50	-	-
1b		>50	>50	-	-
1c		45	>50	-	-

3a		>50	>50	>50	-
2a		>50	>50	-	-
3b		41	>50	>50	-
2b		>50	>50	-	-
3c'		1	>50	>50	>50
2c'		22	9	48	10
1d'		25	47	>50	-
2d'		32	23	>50	-
2e'		38	24	-	-

Le tamoxifène, le principal médicament utilisé en hormonothérapie, est considéré comme contrôle positif dans cette expérience. Ce médicament a été conçu comme un antagoniste des REs bloquant par ce mécanisme les effets mitogènes de l'œstradiol.

Le jaeschkenadiol s'est révélé être totalement inactif ce qui indique que la partie *p*-hydroxybenzoïque contribue à l'effet antiprolifératif de la férutinine. Ce composé est considéré comme le contrôle négatif de l'expérience.

Concernant la lignée MCF-7, le Tableau 23 montre que l'activité la plus élevée est observée pour le composé **3c'** ayant deux carbones saturés entre le carbonyle et la partie phénol. L'élongation de la férutinine par deux carbones après la liaison ester a amélioré l'activité antiproliférative de 38 μ M pour la férutinine à 1 μ M pour **3c'**. En revanche, le remplacement de la liaison par une liaison insaturée dans le composé **2c'** a diminué l'activité antiproliférative par rapport à **3c'** mais a amélioré cette activité en comparaison à la férutinine. Ceci indique que la liaison saturée a conféré une flexibilité à la partie phényle du composé, ce qui permet sa libre rotation dans la cavité tout en optimisant ses interactions dans le LBD du site. Par ailleurs, l'activité antiproliférative a subi une chute lorsque la fonction hydroxyle est absente dans les composés **3b** et **2b**. Ceci indique que l'extension de la férutinine avec une liaison saturée améliore l'activité antiproliférative seulement lorsqu'elle est couplée à la présence d'une liaison hydrogène (conférée par la fonction hydroxyle). Le remplacement de l'hydroxyle par le fluor (un halogène plus électronégatif) qui servira uniquement comme un centre accepteur d'hydrogène dans le cas des composés **1c**, **3a** et **2a**, a diminué l'activité antiproliférative de la férutinine. Le même résultat a été observé lorsque la fonction hydroxyle est masquée par un *tert*-butylate ou pivaloate dans les composés **1a** et **1b**. La perte de l'activité est probablement due à un encombrement stérique non favorable dans leur liaison dans le site des récepteurs. Ces résultats confirment la nécessité d'avoir un centre donneur/accepteur d'hydrogène, apporté dans ce cas par le groupement hydroxyle. C'est un argument supplémentaire sur l'importance de la liaison d'hydrogène dans le processus de liaison dans le site des récepteurs qui confirme l'étude d'Appendino *et al* (Appendino G *et al.*, 2004). D'autre part, l'introduction d'un groupement méthoxy, donneur d'électron, en *méta* de la fonction hydroxyle confère une légère amélioration de l'activité de la férutinine pour les composés **1c'** et **2d'**.

Concernant la lignée MDA-MB-231, le Tableau 23 montre que le seul composé actif est le **2c'** (CI_{50} = 9 μ M). Cette activité est 2 fois plus importante que celle de la férutinine (CI_{50} = 28 μ M). Ceci indique que ce composé exerce ses effets par un mécanisme d'action

indépendant des REs. Des études ultérieures sont nécessaires pour décrypter les voies responsables de la cytotoxicité observée. Ce composé pourrait être considéré comme un chef de file pour définir des futures composés puissants sur des lignées œstrogéno-indépendantes.

Par ailleurs, les composés actifs **2c'** et **3c'** ont été testés pour leur pouvoir cytotoxique sur la lignée immortalisée du sein MCF-10A ainsi que sur les cellules normales aortiques endothéliales HAEC. Les résultats ont montré que le composé **3c'** est sélectif vis-à-vis des cellules cancéreuses, sa CI_{50} est supérieure à 50 μM sur les deux lignées cellulaires contrôles MCF-10A et HAEC. Le composé **2c'** est uniquement sélectif dans le sein MCF-10A ($CI_{50}=48 \mu M$). Ce composé montre une cytotoxicité sur les cellules HAEC, $CI_{50}=10 \mu M$.

Ces molécules sont intéressantes pour leur efficacité sur les deux types de cellules cancéreuses du sein. Cependant, leur mécanisme d'action peut varier en fonction des cellules testées. Il serait donc intéressant de mieux comprendre les voies de signalisation essentielles dans l'induction de la prolifération, l'apoptose ou le maintien de la survie des différentes lignées cellulaires issues du cancer du sein.

IV.8 Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons montré que la férutinine possède une activité antiproliférative vis-à-vis des lignées cellulaires œstrogéno-dépendantes MCF-7 ($CI_{50}= 38 \mu M$) et œstrogéno-indépendantes MDA-MB-231 ($CI_{50}= 28 \mu M$) du sein. Son effet cytotoxique est lié à sa capacité d'accumuler les cellules cancéreuses au niveau de la phase pré G0/G1 du cycle cellulaire induisant ainsi l'apoptose. Dans le cas des cellules MCF-7, la férutinine exerce des effets agonistes vis-à-vis du $RE\alpha$, la signalisation de ce composé faisant en partie par le biais des REs. Nous avons aussi mis en évidence le pouvoir qu'a la férutinine de cibler les CSC dans les deux types de lignées cellulaires étudiées.

Deux analogues **3c'** et **2c'** possèdent des activités antiprolifératives meilleures que celles de la férutinine vis-à-vis des lignées cellulaires cancéreuses MCF-7 et MDA-MB-231, respectivement. Le composé **3c'** a la capacité d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du sein tout en restant non toxiques pour les cellules normales, ce qui constitue un avantage vis-à-vis des effets secondaires des agents chimio-thérapeutiques standards. Ces deux composés étaient bien sélectionnés par le filtre *in silico* défini dans le chapitre 2.

V Etude biologique de la férutinine et de ses analogues sur la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses de la prostate et des ovaires

La prostate représente le cancer le plus fréquent chez les hommes. La survie et la prolifération cellulaire de la prostate sont soutenues par les androgènes et à moindre degré par les œstrogènes. Sa privation de cette influence hormonale peut inhiber la prolifération et/ou entraîner la mort des cellules cancéreuses et permettre des effets anti-tumoraux durables.

Par contre, l'impact des hormones sur le cancer des ovaires est encore débattu, mais il semblerait que les œstrogènes jouent un rôle important dans le développement, la croissance, l'invasion et la métastase des tumeurs ovariennes. Les chiffres montrent que 61 % à 79 % des cancers ovariennes expriment les REs. Le traitement par le tamoxifène est capable de guérir 13% des cancers et amène un stade stable à 32 % des patientes (Zheng *et al*, 2007).

Dans ce chapitre est exposé l'effet de la férutinine sur :

- la prolifération, le cycle, la migration et l'invasion cellulaire, les cellules souches/progénitrices cancéreuses de différentes lignées de cancer de prostate.
- la prolifération, le cycle cellulaire, les cellules souches/progénitrices cancéreuses de différentes lignées de cancer des ovaires.

Trois analogues hémi-synthétiques de la férutinine sont testés pour leur activité antiproliférative sur les différentes lignées de cancer de la prostate et des ovaires.

V.1 Effet de la férutinine et de ses analogues sur le cancer de la prostate

Les lignées cellulaires, choisies dans le cadre de cette étude, possèdent un profil hormonal variable représentant ainsi l'hétérogénéité au niveau du tissu prostatique. Ces lignées cellulaires proviennent de métastases de patients souffrant d'un carcinome prostatique résistant à la castration (**22Rv1**), de métastases osseuses (**PC-3**) ou cérébrales (**DU 145**). La lignée 22Rv1 reflète les stades tardifs de la maladie.

Les différentes lignées établies ont une croissance qui est soit dépendante de la présence d'androgènes (RWPE-1) (cellules prostatiques normales), soit indépendante des androgènes mais qui peut toujours être stimulée par ceux-ci (22Rv1) ou encore complètement

indépendante des androgènes comme les cellules cancéreuses prostatiques PC-3 et DU 145. Ces lignées cellulaires, contrairement à la majorité des cancers prostatiques hormono-réfractaires, n'expriment plus les RAs et représentent donc un pauvre modèle de la résistance à l'ablation androgénique (Van Bokhoven A *et al.*, 2003).

Le statut hormonal de ces lignées est représenté dans le Tableau 35 ci-dessous.

Tableau 35 : Les caractéristiques des différentes lignées cellulaires prostatiques utilisées dans l'étude.

Lignées cellulaires	Origines	RE α	RE β	AR
PC-3	Métastase osseuse	+	+	-
DU 145	Métastase cérébrale	-	+	-
22Rv1	Xénogreffe résistante a la castration	+/-	+/-	+
RWPE-1	Prostate	+/-	+	+

V.1.1 La férutinine est un inhibiteur potentiel de la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses de la prostate *in vitro*

L'effet de la férutinine sur la prolifération des cellules prostatiques a été effectué par le test d'exclusion au bleu de Trypan et le test colorimétrique au MTT.

Différentes concentrations de la férutinine ont été testées sur trois lignées cellulaires de cancer de la prostate (PC-3, DU 145 et 22Rv1) pendant trois intervalles de temps 24 h, 48 h et 72 h post-traitement (Figure 91).

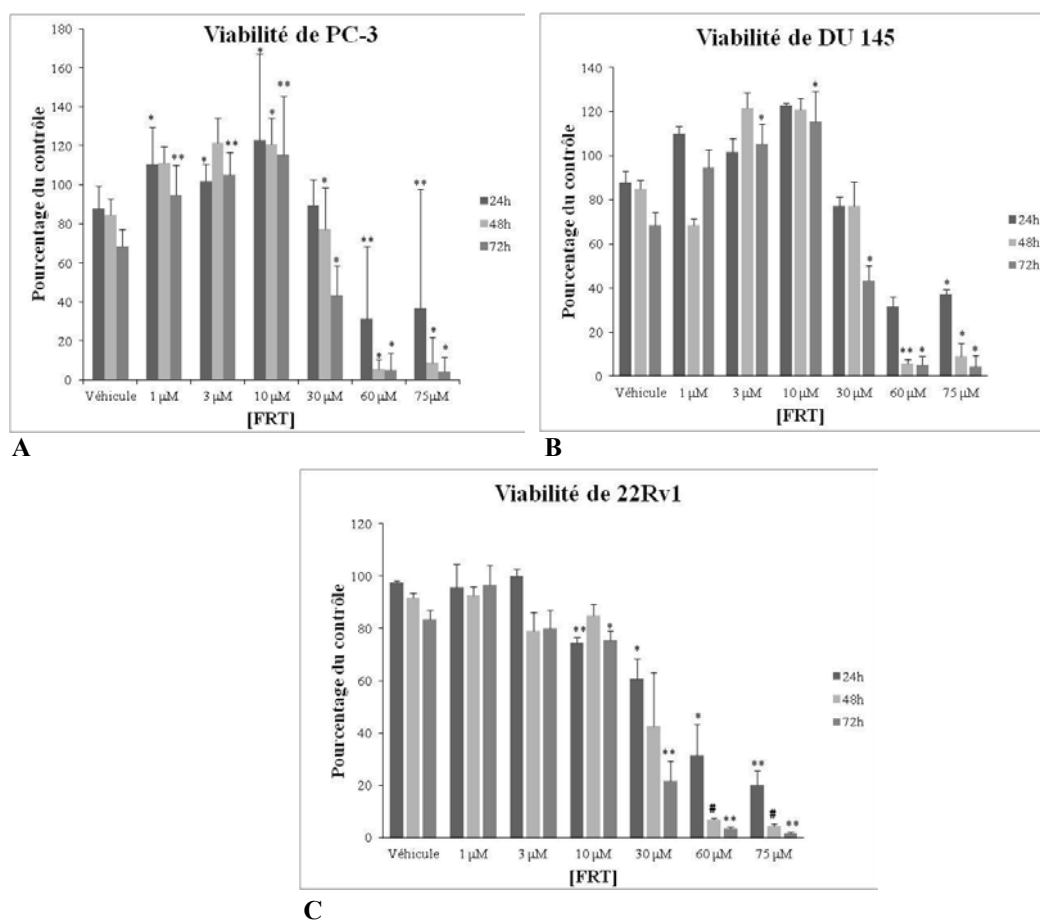


Figure 91 : Viabilité cellulaire des lignées cellulaires prostatiques suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après 24 h, 48 h et 72 h. Comparaison du pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au contrôle pour les cellules (A) PC-3, (B) DU 145 et (C) 22Rv1. Le traitement a été effectué 24 h après l'ensemencement des cellules à raison de 20 000 cellules/puits dans une plaque de 24 puits. Le comptage des cellules a été fait avec le bleu de Trypan en utilisant l'hemocytomètre. Chaque expérience a été réalisée en triplicata. *, ** et # indiquent une différence significative par rapport au véhicule avec $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,005$ respectivement (test de Student).

Les résultats montrent que la férutinine possède un effet biphasique non significatif sur la prolifération des deux lignées PC-3 et la DU 145 exprimant les REs. Son effet cytotoxique a été observé à des concentrations élevées avec une CI_{50} de 31 μ M pour les deux lignées cellulaires et à 72 h post-traitement. D'autre part, la férutinine inhibe la prolifération de la lignée 22Rv1 d'une manière dose dépendante avec une CI_{50} de 27 μ M après 72 h de traitement (Figure 91).

La prolifération cellulaire a été aussi testée par le test MTT. Les résultats sont inconsistants avec ceux obtenus par le bleu de Trypan. La Figure 92 montre que l'effet antiprolifératif de la férutinine est presque absent à des concentrations élevées de l'ordre de 75 μ M, dans le cas des trois lignées et après 72 h de traitement.

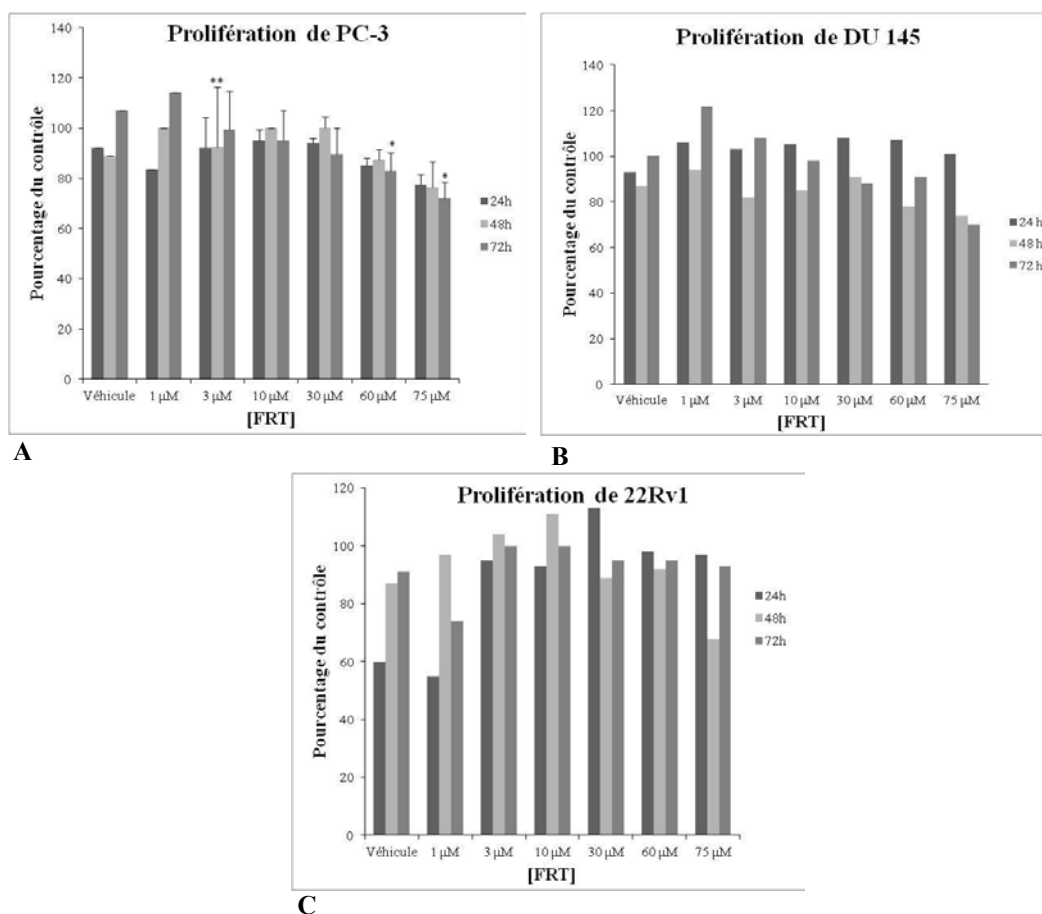


Figure 92 : Prolifération cellulaire des lignées (A) PC-3, (B) DU 145 et (C) 22Rv1 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après 24 h, 48 h et 72 h. Le traitement a été effectué après 24 h d'ensemencement des cellules à raison de 3000 cellules/puits pour PC-3, DU 145 et de 7500 cellules/puits pour 22Rv1 dans une plaque de 96 puits. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 595 nm. L'expérience de PC-3 est la représentante de n=2 alors que celle de DU 145 et 22Rv1 de n=1. * et ** indiquent une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test de Student).

Ces résultats peuvent être expliqués par plusieurs hypothèses :

- Absence de l'effet de la férutinine sur l'activité mitochondriale chez ces trois lignées cellulaires. Donc, la diminution de la prolifération n'est pas due à une perturbation de l'activité mitochondriale (Wang S *et al.*, 2011).
- La férutinine est connue pour ses effets perturbateurs de la perméabilité membranaire (Macho A *et al.*, 2004), ce qui pourrait expliquer les différences de résultats entre le test de bleu de Trypan et le MTT.
- Dans certains cas, un composé d'intérêt peut activer les glycoprotéines-P d'efflux cellulaire (MDR1, *Multi Drug Resistance*), augmentant ainsi l'efflux cellulaire du colorant MTT, ce qui limite l'utilisation du test MTT (Vellonen KS *et al.*, 2004).

Au vue de la limitation du test MTT, l'effet de la férutinine et de ses analogues sur les lignées de cancer de la prostate, seront uniquement testés avec le test d'exclusion cellulaire au bleu de Trypan.

V.1.2 La férutinine est relativement sélective vis-à-vis des cellules cancéreuses prostatiques

Afin de tester sa sélectivité, la férutinine est évaluée pour son activité cytotoxique sur la lignée cellulaire normale de la prostate, RWPE-1 (Figure 93).

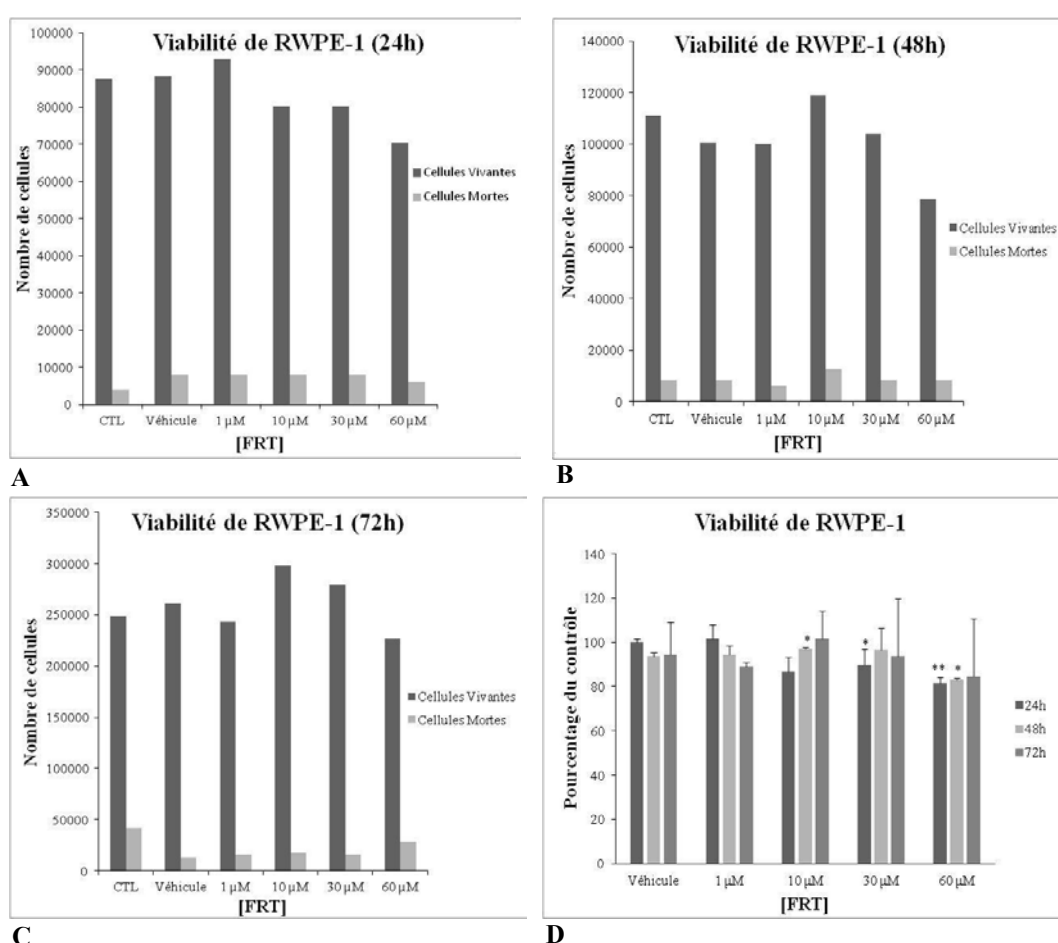


Figure 93 : Viabilité cellulaire de la lignée RWPE-1 suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations après (A) 24 h, (B) 48 h et (C) 72 h. (D) Comparaison du pourcentage de viabilité cellulaire par rapport au contrôle en fonction de la concentration et de la durée du temps. Le traitement a été effectué 24 h après l'ensemencement des cellules à raison de 35 000 cellules/puits dans une plaque de 24 puits. Le comptage des cellules a été fait au le bleu de Trypan en utilisant l'hémocytomètre. Chaque expérience a été réalisée en triplicata. * et ** indiquent une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test de Student).

La férutinine influence légèrement la viabilité de la lignée normale du cancer de la prostate RWPE-1. Elle a un effet minimal sur la viabilité cellulaire même après 72 h de

traitement sur toute la gamme de concentration testée. La férutinine possède la même activité cytotoxique ($CI_{50} \sim 30 \mu M$) sur les trois lignées cellulaires prostatiques, comparable à celle trouvée chez la lignée cancéreuse du sein MDA-MB-231. Ces résultats suggèrent que l'effet cytotoxique de la férutinine est indépendant des REs, vue que les lignées cellulaires prostatiques possèdent un nombre faible de récepteurs en comparaison avec les lignées cellulaires du sein.

V.1.3 La férutinine induit une accumulation des cellules au niveau de la phase pré G0/G1 du cycle cellulaire

L'effet de la férutinine a été testé sur le cycle cellulaire de la lignée prostatique PC-3. L'analyse de la progression des cellules a été effectuée suite au traitement par différentes concentrations en férutinine et à trois intervalles de temps (Figure 94).

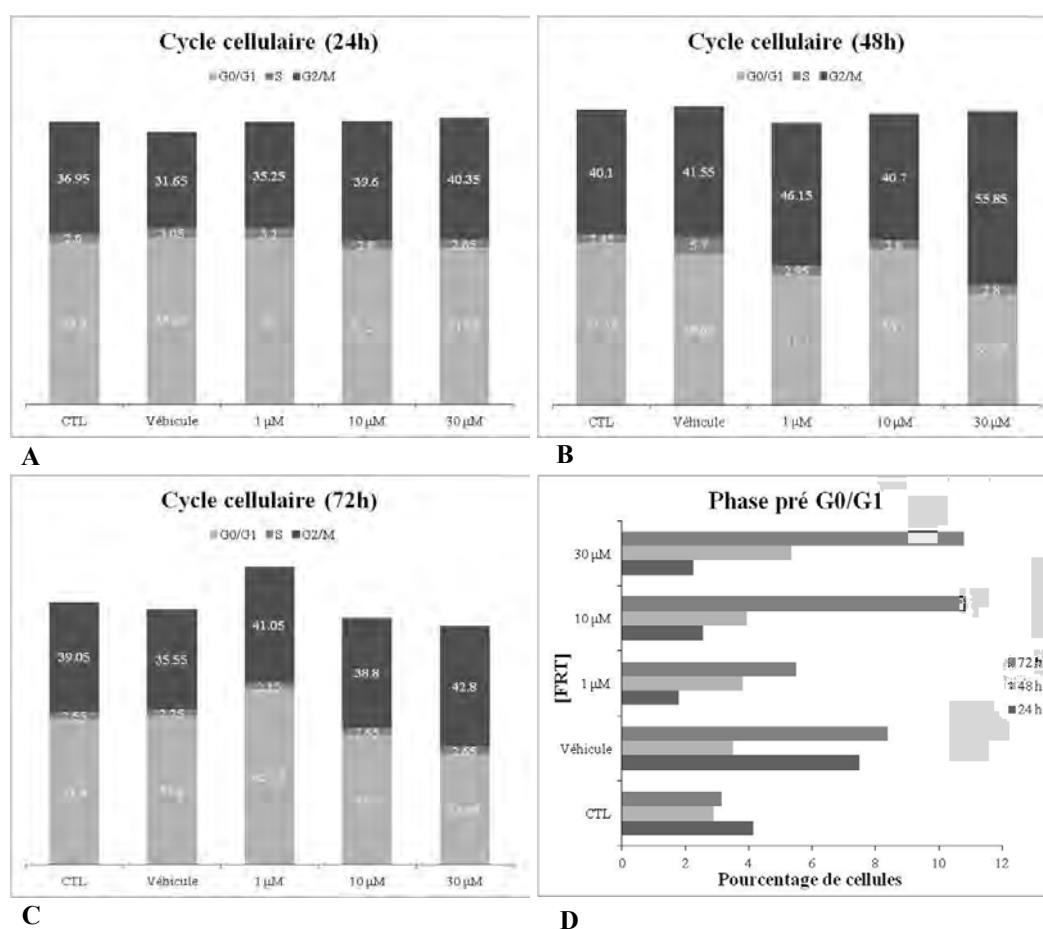


Figure 94 : Analyse de la progression du cycle cellulaire des cellules PC-3 traitées par la férutinine à différentes concentrations. Les cellules ont été traitées par 1, 10 et 30 μM pendant différents temps (A) 24 h, (B) 48 h et (C) 72 h. (D) Répartition des cellules dans la phase pré G0/G1. La distribution dans

les différentes phases du cycle cellulaire a été évaluée par cytométrie de flux après marquage à l'iodure de propidium. Les résultats représentent les valeurs de l'expérience n=1.

Les résultats obtenus montrent qu'il n'y a pas de variation au niveau du cycle cellulaire (phases G0/G1, S et G2/M). D'autre part, une accumulation de 40 % des cellules PC-3 au niveau de la phase pré G0/G1 a été observée après 72 h de traitement par la férutinine ([FRT]= 10 μ M et 30 μ M). Ceci indique que la férutinine induit la mort cellulaire, probablement par apoptose, effet confirmé par la présence des cellules mortes sous microscope optique. Ces effets pourraient être imputables à des activités cytotoxiques de ce produit.

Plusieurs analyses fonctionnelles ont été faites uniquement sur la lignée PC-3 exprimant les deux types de récepteurs RE α et β .

V.1.4 La férutinine retarde la migration et l'invasion cellulaire

Dans la cancérogenèse, processus multi-étapes, les cellules tumorales sont capables de subir des modifications leur permettant de se détacher de la tumeur primaire, de traverser la membrane basale sous-jacente, de se disséminer à travers l'organisme via le réseau sanguin/lymphatique et d'envahir le tissu sain avoisinant. Les modifications cellulaires sont regroupées sous le terme de la transition épithéliale-mésenchymateuse (TEM).

L'invasion et la migration cellulaires sont induites par des facteurs chimiques et/ou physiques sécrétés par les cellules elles-mêmes ou grâce aux facteurs présents dans le microenvironnement. Le niveau d'invasion est considéré comme étant un déterminant majeur dans le degré de malignité des cancers (Friedl P et Wolf K, 2003).

L'effet de la férutinine sur l'invasion cellulaire a été effectué par le test de la chambre de Boyden « *transwell invasion assay* ». C'est un modèle de test *in vitro* qui permet d'évaluer la capacité des cellules à envahir une matrice, le matrigel. Les cellules PC-3 sontensemencées sur la surface d'une membrane, de porosité 8 μ m, couvert du matrigel (représentant le modèle artificiel de la matrice extracellulaire). Dans des conditions normales, les cellules attirées par des chimio-attracteurs présents dans la partie inférieure du puit, s'adhèrent au matrigel, sécrètent des enzymes pour le digérer et migrent à travers les pores. Ces cellules seront donc attrapées par une membrane de nitrocellulose, colorées et comptées.

La férutinine (30 μM) a été testée pour son activité sur la migration et l'invasion cellulaire de la lignée PC-3 (Figure 95).

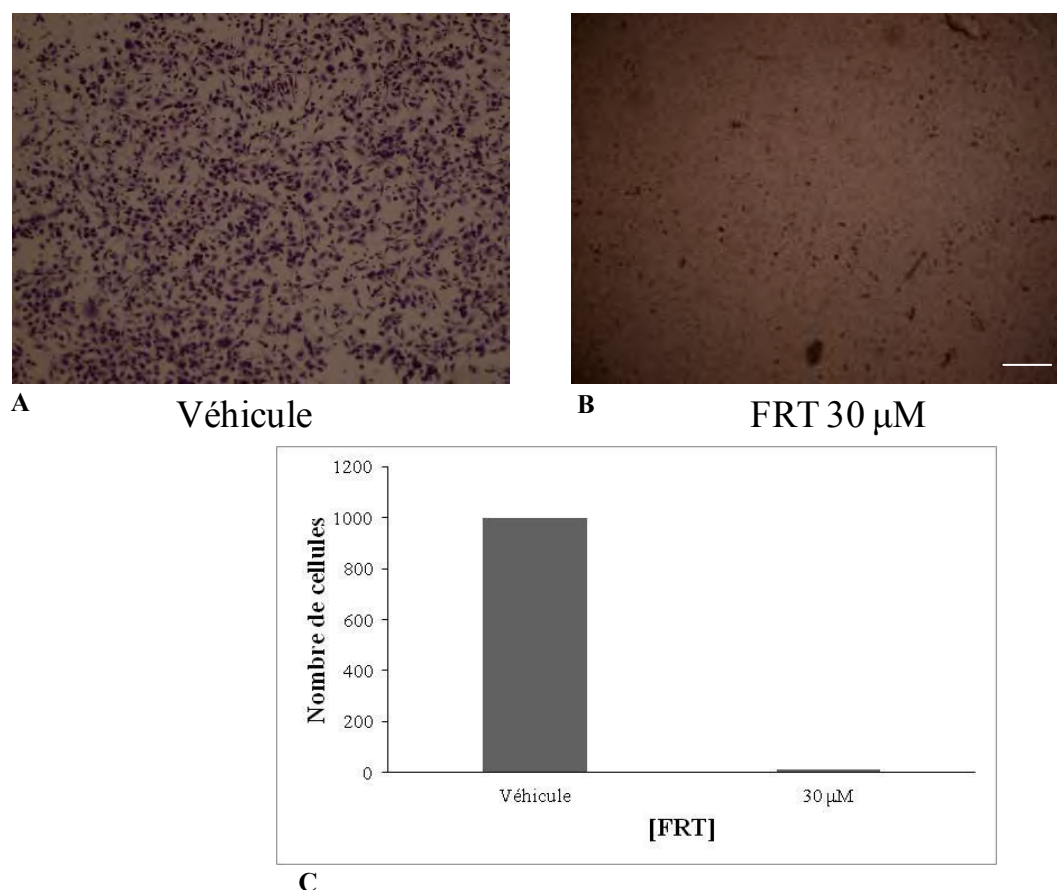
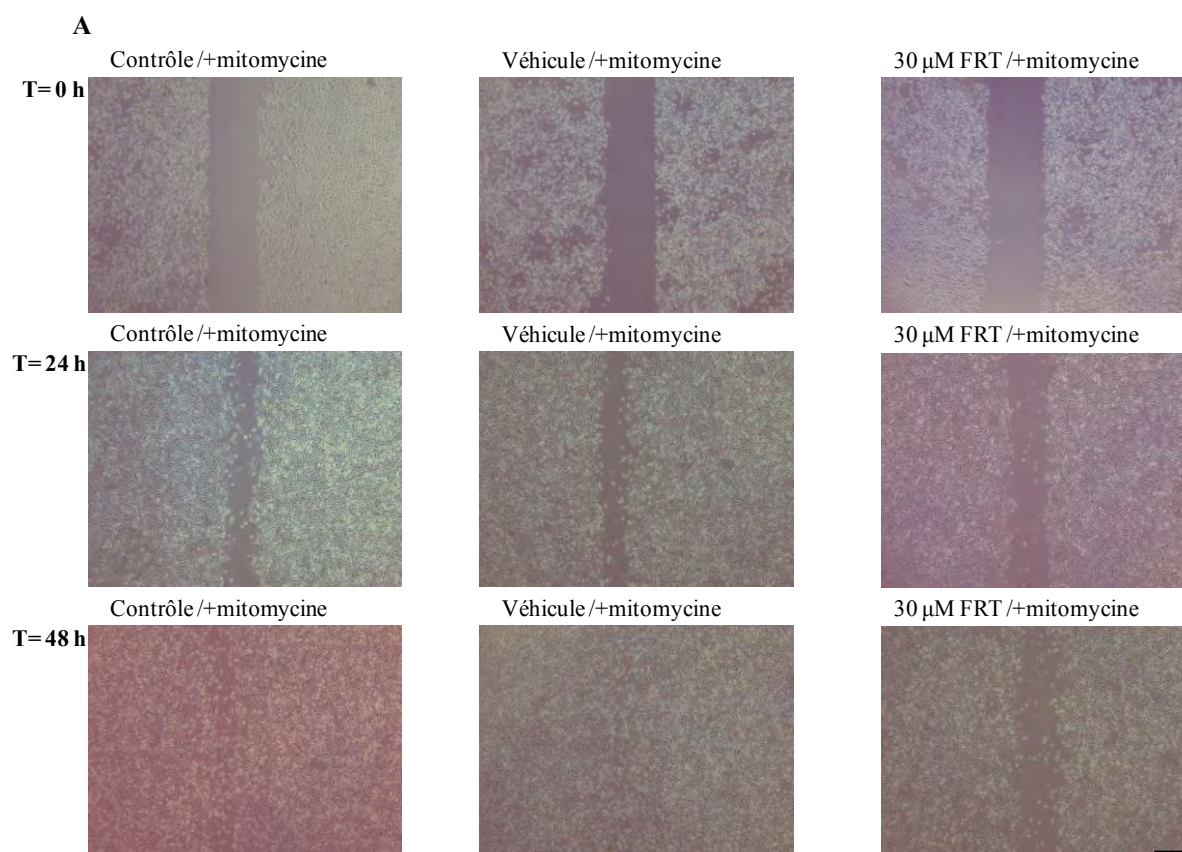


Figure 95 : Test de la chambre de Boyden : effet de la férutinine sur l'invasion cellulaire de la lignée PC-3. (A et B) sont les images représentatives du test d'invasion cellulaire. Les cellules PC-3 sontensemencées à la surface d'une membrane couverte avec le matrigel, dans une chambre de Boyden. (A) Invasion basale des cellules (véhicule). (B) Invasion des cellules suite au traitement par 30 μM de férutinine pendant 48 h. Les cellules sont fixées au formaldéhyde, colorées en utilisant le marquage à l'hémathoxyline et l'éosine (H&E) et comptées. Les photos ont été prises au microscope optique. Barre d'échelle, 50 μm . (C) Histogramme représentant le nombre de cellules après invasion. Les résultats représentent les valeurs de l'expérience n=1.

La férutinine est capable d'inhiber complètement l'invasion cellulaire de la lignée PC-3 en comparaison avec le contrôle. Le processus de colonisation cellulaire combine à la fois les effets de croissance et de mobilité cellulaire. La férutinine a été évaluée pour son effet sur la migration cellulaire grâce à un test de la cicatrice ou « *wound healing assay* » (Rodriguez LG *et al.*, 2005). Le concept de ce test est basé sur le processus de cicatrisation d'une plaie où les cellules migrent pour restaurer un tissu endommagé. Une blessure est réalisée à travers un tapis cellulaire puis la capacité des cellules à recoloniser la plaie est suivie. La mitomycine est

ajoutée au milieu dans le but d'inhiber la division cellulaire. La fermeture du canal serait due alors uniquement au processus de migration.

La migration cellulaire de la lignée PC-3 a été suivie après traitement par une concentration de 30 μ M de férutinine après 24 h, 48 h et 72 h (Figure 96).



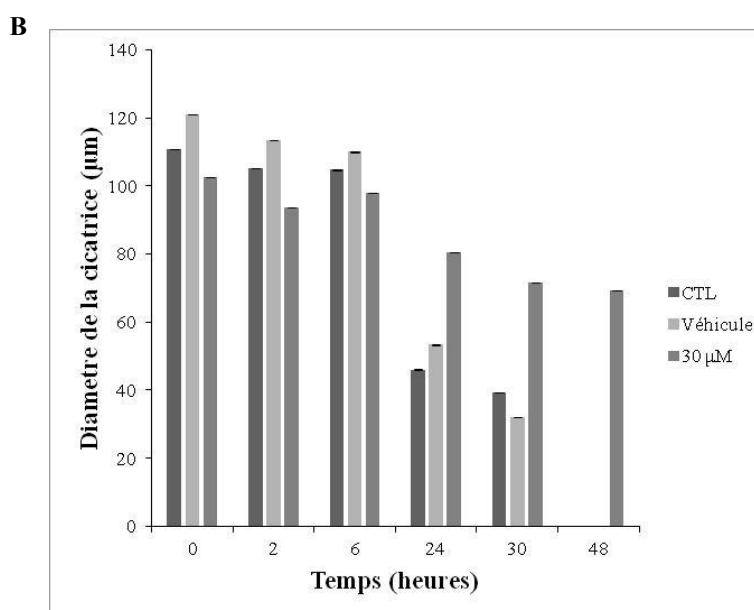


Figure 96 : Effet de la férutinine sur l'invasion cellulaire par le test de la cicatrice dans le cas de la lignée cellulaire PC-3. (A) Photos prises avec le microscope optique suite à la griffe au même endroit, à trois intervalles de temps différents (24 h, 48 h et 72 h). CTL= cellules dans le milieu de culture avec mitomycine, Véhicule= Cellules dans le milieu de culture avec mitomycine et DMSO. Barre d'échelle, 50 µm. (B) Histogramme représentant la variation du diamètre de la cicatrice en fonction du temps. Les valeurs sont les moyennes de l'expérience n=1.

Les photos (Figure 96) montrent la progression de recolonisation de la cicatrice en absence (CTL) ou en présence de la férutinine. L'inhibition du processus de colonisation cellulaire est mise en évidence par la valeur du diamètre de la cicatrice. La férutinine inhibe le processus de colonisation cellulaire d'une façon précoce. Près de 50% de l'inhibition est atteinte dans les 24h post-traitement.

L'habileté des cellules tumorales à migrer *in vitro*, à travers la matrice extracellulaire se fait via l'expression coopérative d'intégrines, une famille de récepteurs d'adhésion, et des protéinases de surface cellulaire (Singh S *et al.*, 2004). Pour mieux comprendre cet effet, une investigation plus poussées sur les marqueurs de l'invasion est nécessaire. Le test fonctionnel par zymographie avec la gélatine qui met en évidence l'activité des métalloprotéinases (MMP) ainsi que leur niveau d'expression peuvent avancer des explications dans ce domaine.

Nombreux facteurs de croissance et leurs récepteurs sont surexprimés par les tumeurs prostatiques. Une mutation de leurs gènes correspondants induit une augmentation de l'agressivité tumorale par réduction de l'apoptose et l'augmentation de la prolifération cellulaire (Craft N *et al.*, 1999). Il est donc intéressant de compléter cette étude par l'évaluation de la variation des marqueurs de la TEM (N-cadhérine, E-cadhérine, β -caténine,

snail, twist, vimentine) et de l'angiogénèse, VEGF pour accéder à une vue complète de l'effet métastatique induit par la férutinine.

V.1.5 La férutinine cible la population enrichie de cellules souches/progénitrices des cellules cancéreuses prostatiques

Le test de formation des sphères en culture 3D a été utilisé pour évaluer la capacité de la férutinine à inhiber ou à enrichir la population des CSC prostatique.

Trois concentrations de férutinine (1, 10 et 30 μ M) ont été appliquées sur les cellules PC-3 et DU 145 en culture. Après 13 jours de culture, la formation des sphères a été évaluée par le calcul de l'UFS.

Dans un premier temps, l'effet de la férutinine a été observé sur les cellules PC-3 en culture 3D (Figure 97).

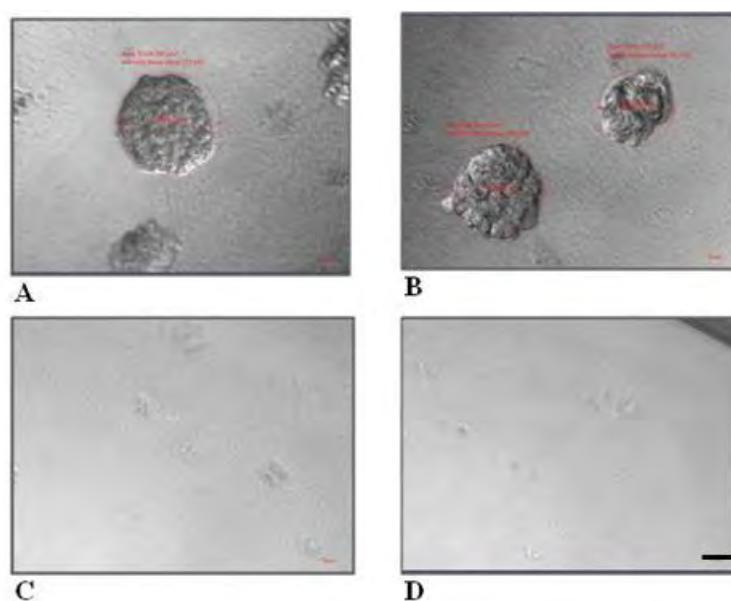


Figure 97 : Inhibition de la prolifération et de la taille des sphères traitées par la férutinine chez la lignée PC-3. (A) CTL, (B) Véhicule, (C) FRT 10 μ M et (D) FRT 30 μ M. Les photos ont été visualisées sous le microscope optique. Barre d'échelle, 50 μ m.

La taille ainsi que les valeurs de l'UFS sont présentées dans la Figure 98.

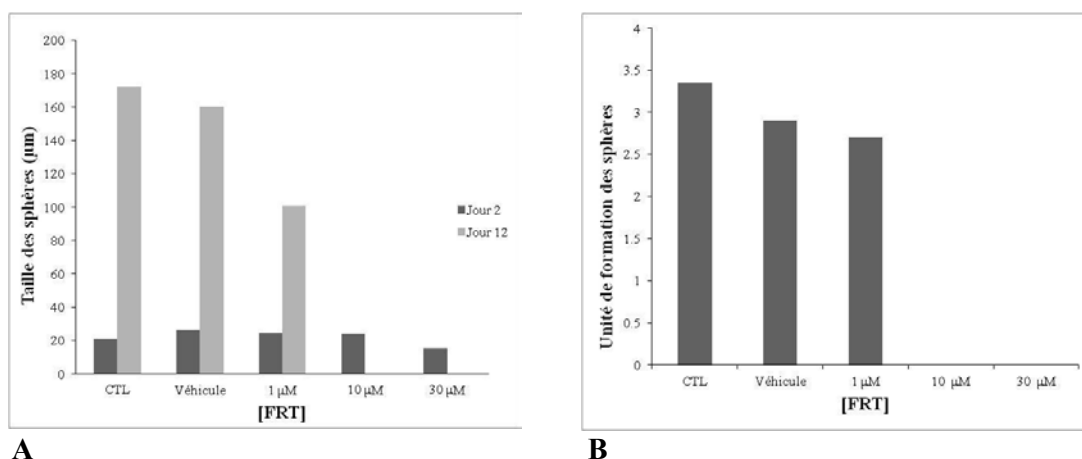


Figure 98 : Représentation des sphères obtenues à partir de la lignée PC-3. **(A)** Taille des sphères (diamètres) suite au traitement par la férutinine avec une comparaison entre le jour 2 et le jour 12 des cellules PC-3 en culture 3D. **(B)** Unité de formation des sphères en fonction de la concentration en férutinine. Les résultats représentent les valeurs de l'expérience n=1.

Les résultats montrent que la formation des sphères est complètement inhibée (UFS= 0) à des concentrations en férutinine supérieures à 10 µM en comparaison avec le contrôle (UFS= 3,5). Par contre à 1 µM, la férutinine était capable de former des sphères (UFS= 3) mais de tailles plus réduites (100 µm) que celles du contrôle (180 µm) (Figure 98).

Dans un second temps, l'effet de la férutinine sur la formation des sphères à partir de la lignée DU 145 a été analysé (Figure 99).

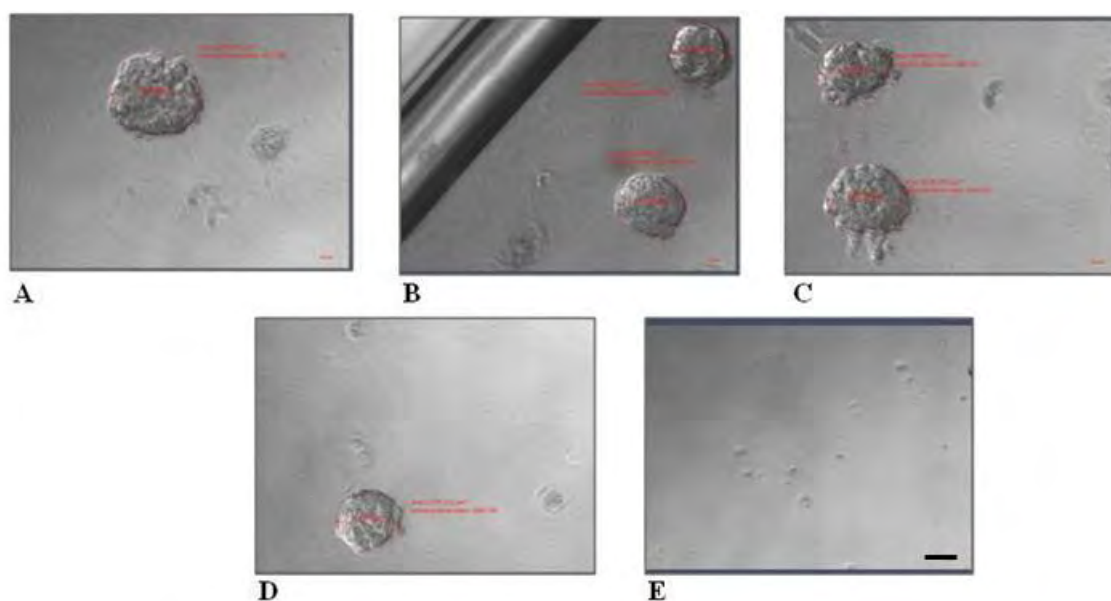


Figure 99 : Inhibition de la prolifération et de la taille des sphères traitées par la férutinine dans la lignée DU 145. **(A)** CTL, **(B)** Véhicule, **(C)** FRT 1 µM, **(D)** FRT 10 µM et **(E)** FRT 30 µM. Les photos sont visualisées sous le microscope optique. Barre d'échelle, 50 µm.

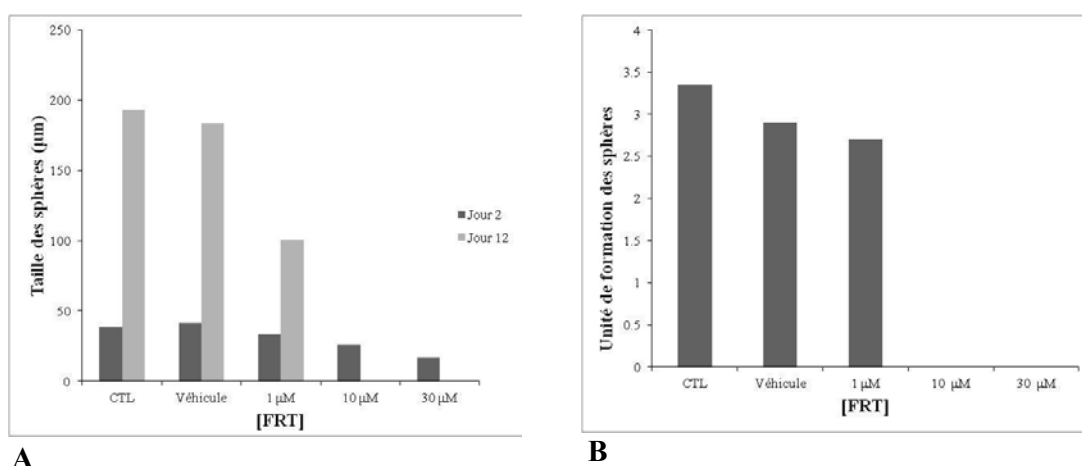


Figure 100 : Représentation des sphères obtenues à partir de la lignée DU 145. (A) Taille des sphères suite au traitement par la férutinine avec une comparaison entre le jour 2 et le jour 12 des cellules DU 145 en culture 3D. (B) Unité de formation des sphères en fonction de la concentration en férutinine. Les résultats représentent les valeurs de l'expérience n=1.

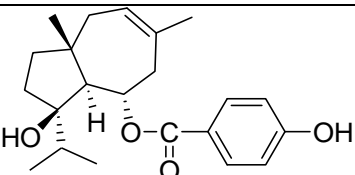
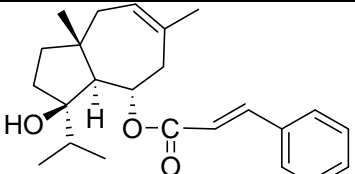
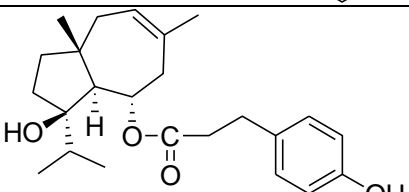
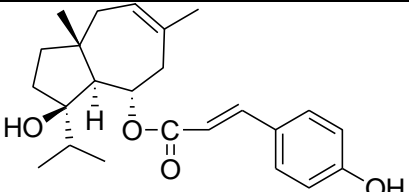
Les résultats montrent qu'après 13 jours de culture, les cellules DU 145 forment des sphères dans des conditions non traitées par la férutinine (contrôle et véhicule) avec une UFS= 4. Le traitement par 10 µM et 30 µM de férutinine inhibe complètement la formation des sphères (UFS= 0). D'autre part, 1 µM de férutinine est capable de former des sphères (UFS= 3) mais de tailles plus réduites (100 µm) que celles du contrôle (200 µm) (Figure 100).

Pour mieux caractériser cette population sphérique, une analyse des marqueurs de différenciations ou de dédifférenciations à la surface des cellules ($CD44^{fort}$ et $CD28^{faible}$) serait importante.

V.1.6 L'analogue 2c' est le candidat potentiel pour le traitement du cancer prostatique

Trois analogues (**2b**, **3c'** et **2c'**) ont fait le sujet du test de viabilité cellulaire sur les deux lignées cellulaires PC-3 et DU 145. Ces composés sont structuralement apparentés avec des différences dans la présence/absence de la fonction hydroxyle (**2b** vs **3c'** et **2c'**) ou dans la saturation de la liaison après la fonction ester (**3c'** vs **2c'**). La viabilité cellulaire a été suivie par le test au bleu de Trypan après 24 h, 48 h et 72 h du traitement par les différentes concentrations d'analogues. Les résultats sont exposés dans le Tableau 36 ci-dessous.

Tableau 36 : Valeurs des CI_{50} d'analogues hémi-synthétiques de la férutinine sur deux lignées cellulaires de la prostate PC-3 et DU-145. Les résultats représentent la moyenne de deux expériences différentes par le test au bleu de Trypan, 72 h post-traitement.

Produits	Structures	Lignées cellulaires CI_{50} (μM)	
		PC-3	DU 145
Férutinine		31	30
2b		>50	>50
3c'		>50	29
2c'		5	26

L'analogue **2c'** est 6 fois plus actif que la férutinine surtout sur la lignée PC-3 ($CI_{50} = 5 \mu M$). La fonction hydroxyle reste toujours importante pour l'activité cytotoxique. L'élargissement de la molécule de deux carbones liés par une liaison insaturée après la fonction ester a amélioré l'activité cytotoxique de la férutinine.

L'effet différentiel observé pour le même composé **2c'** sur les deux lignées PC-3 et DU 145 suppose l'intervention de plusieurs mécanismes d'action dans sa cytotoxicité. Des études comparatives plus avancées des voies stimulées par ce composé chez les deux lignées prostatiques pourraient soutenir des explications sur l'implication probables des REs.

V.2 Effet de la ferutinine et de ses analogues sur le cancer des ovaires

La complexité des tumeurs ovariennes tient à la multiplicité des types lésionnels rencontrés, conséquences d'une embryogénèse complexe. Il existe de nombreuses formes histologiques du cancer de l'ovaire. Les lignées cellulaires choisies pour cette étude possèdent des statuts hormonaux différents (Tableau 37).

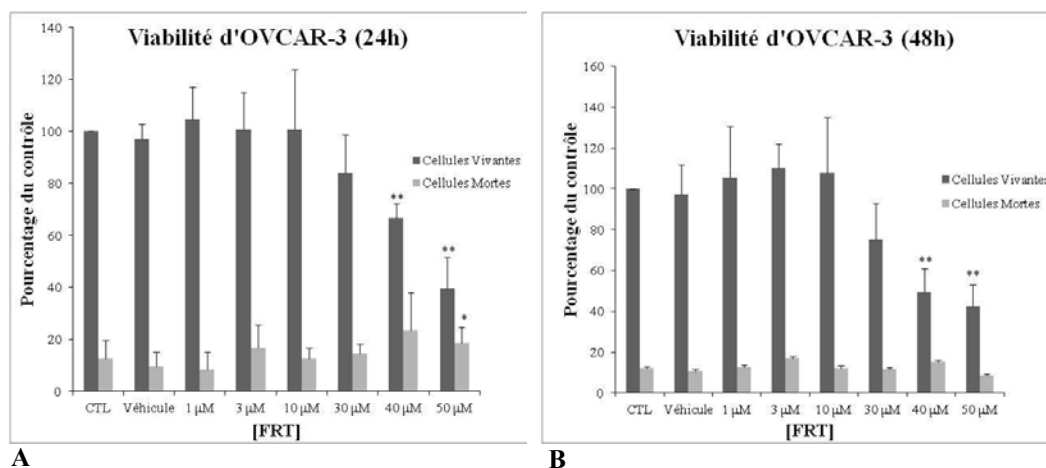
Tableau 37 : Les caractéristiques des différentes lignées cellulaires ovariennes utilisées dans notre étude.

Lignées cellulaires	Origine	RE α	RE β	AR
OVCAR-3	Ascites malignes d'adénocarcinome après une combinaison de chimiothérapie	+	+	+
SKOV-3	Fluide ascitique d'une femme âgée de 64 ans	Muté	+	-
IGROV-1	Tumeur primaire d'une femme âgée de 47 ans	-	-	-

V.2.1 La férutinine est un inhibiteur potentiel de la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses ovariennes *in vitro*

L'effet de la férutinine sur la viabilité des cellules cancéreuse ovariennes a été enregistré suite à un traitement pendant 24, 48 et 72 h (24, 48, 72 et 96 h pour la lignée OVCAR-3 en raison du temps élevé de dédoublement de cette lignée cellulaire de 56 h).

L'effet de la férutinine sur la viabilité des cellules OVCAR-3 est illustré dans la Figure 101.



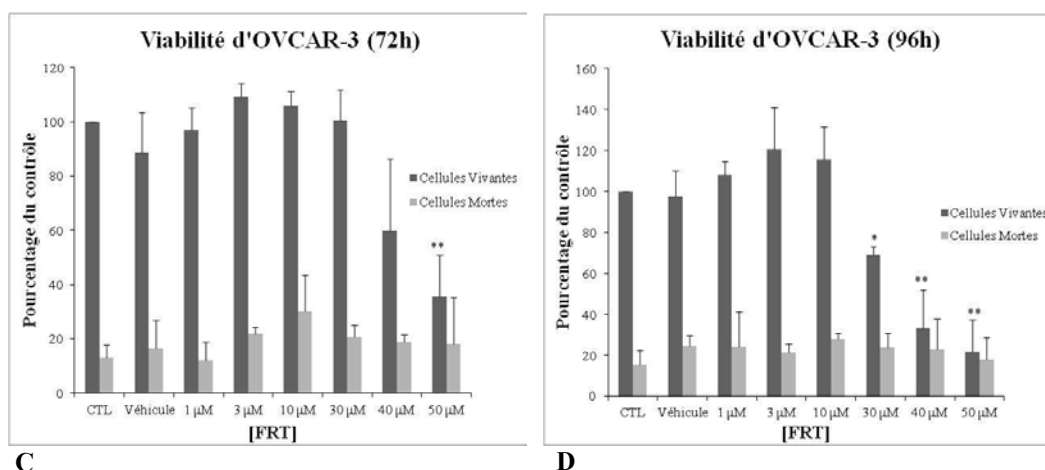
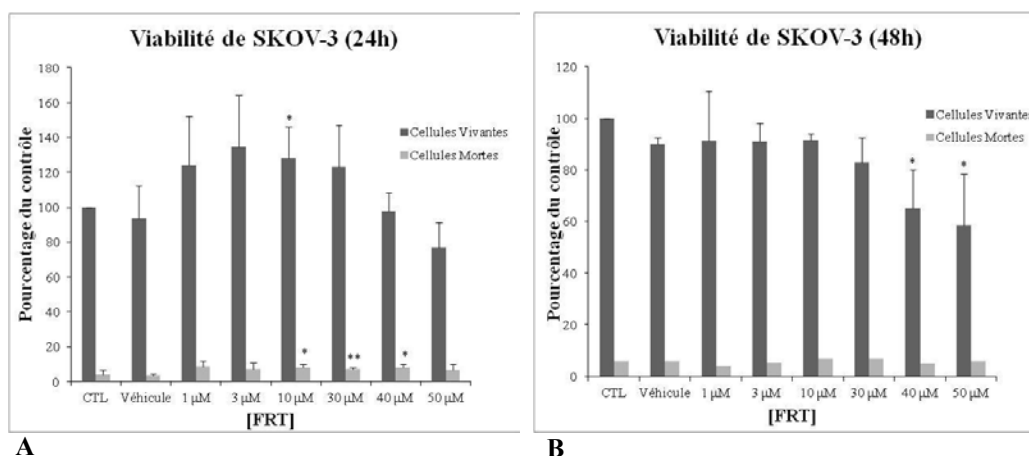


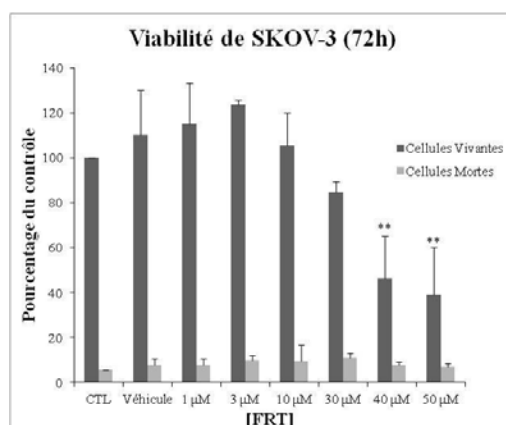
Figure 101 : Viabilité cellulaire de la lignée OVCAR-3 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations pour (A) 24 h, (B) 48 h, (C) 72 h et (D) 96 h.

Le pourcentage des cellules mortes est calculé suivant la formule : nombre des cellules mortes x 100/nombre de cellules vivantes. Le traitement a été effectué 24 h après l'ensemencement des cellules à raison de 40 000 cellules/puits dans une plaque de 24 puits. Le comptage des cellules a été fait avec le bleu de Trypan en utilisant l'hemocytomètre. Chaque expérience a été réalisée en triplicate. * et ** indiquent une différence significative par rapport au véhicule avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test de Student).

La férutinine induit la mort des cellules OVCAR-3 avec une CI_{50} de l'ordre de 50 μ M.

L'effet de la férutinine sur la viabilité des cellules SKOV-3 est illustré dans la Figure 102.



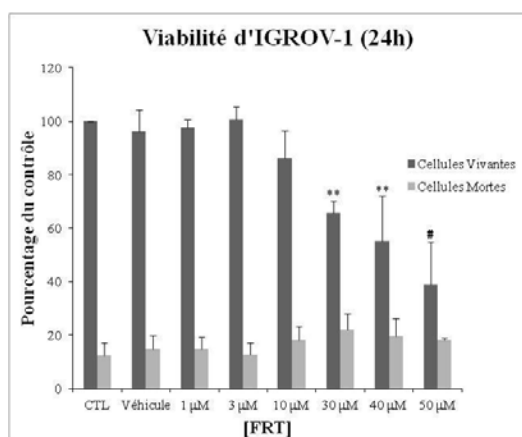


C

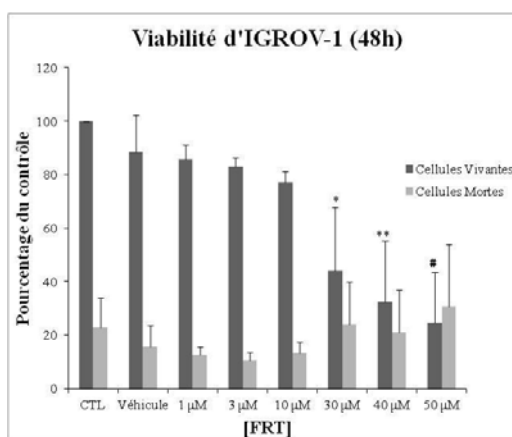
Figure 102 : Viabilité cellulaire de la lignée SKOV-1 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations pour (A) 24 h, (B) 48 h et (C) 72 h. Le pourcentage des cellules mortes est calculé suivant la formule : nombre des cellules mortes x 100/nombre de cellules vivantes. Le traitement a été effectué 24 h après l'ensemencement des cellules à raison de 20 000 cellules/puits dans une plaque de 24 puits. Le comptage des cellules a été fait avec le bleu de Trypan en utilisant l'hémocytomètre. Chaque expérience a été réalisée en triplicata. * et ** indiquent une différence significative par rapport au contrôle avec $p < 0,05$ et $p < 0,01$ respectivement (test de Student).

La férutinine induit la mort des cellules SKOV-3 avec une CI_{50} de l'ordre de 40 μ M.

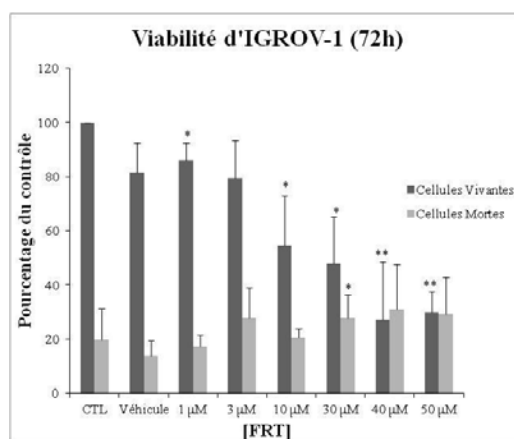
L'effet de la férutinine sur la viabilité des cellules IGROV-1 est illustré dans la Figure 103.



A



B



C

Figure 103 : Viabilité cellulaire de la lignée IGROV-1 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations pour (A) 24 h, (B) 48 h et (C) 72 h. Le pourcentage des cellules mortes est calculé suivant la formule : nombre des cellules mortes x 100/nombre de cellules vivantes. Le traitement a été effectué 24 h après l'ensemencement des cellules à raison de 35 000 cellules/puits dans une plaque de 24 puits. Le comptage des cellules a été fait avec le bleu de Trypan en utilisant l'hemocytomètre. Chaque expérience a été réalisée en triplicate. *, ** et # indiquent une différence significative par rapport au véhicule avec $p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,005$ respectivement (test de Student).

La férutinine induit la mort des cellules IGROV-1 avec une CI_{50} de l'ordre 39 μM .

Le test d'exclusion au bleu de Trypan a montré que la férutinine possède un effet cytotoxique modéré ($CI_{50} > 40 \mu M$) sur les cellules cancéreuses ovariennes (Figure 101, Figure 102 et Figure 103). Ces concentrations sont identiques pour les trois lignées, malgré que leur profil hormonal soit différent. Ce résultat suggère que l'effet cytotoxique induit par la férutinine est indépendant des REs. Dans le cas de la lignée SKOV-3, la population des cellules mortes reste presque constante dans toutes les conditions de traitement. Ce résultat est en faveur d'un effet cytostatique et non pas cytotoxique de la férutinine sur cette lignée. Dans la lignée IGROV-1, une augmentation progressive des cellules mortes a été observée avec l'augmentation de la concentration de la férutinine. En revanche, une légère augmentation de la population des cellules mortes dans les cellules OVCAR-3 est observée. Elle est due à la forte présence des débris cellulaires incomptables.

L'activité antiproliférative de la férutinine a été suivie par le test colorimétrique MTT sur les deux lignées cellulaires OVCAR-3 et IGROV-1 à différents intervalles de temps (Figure 104).

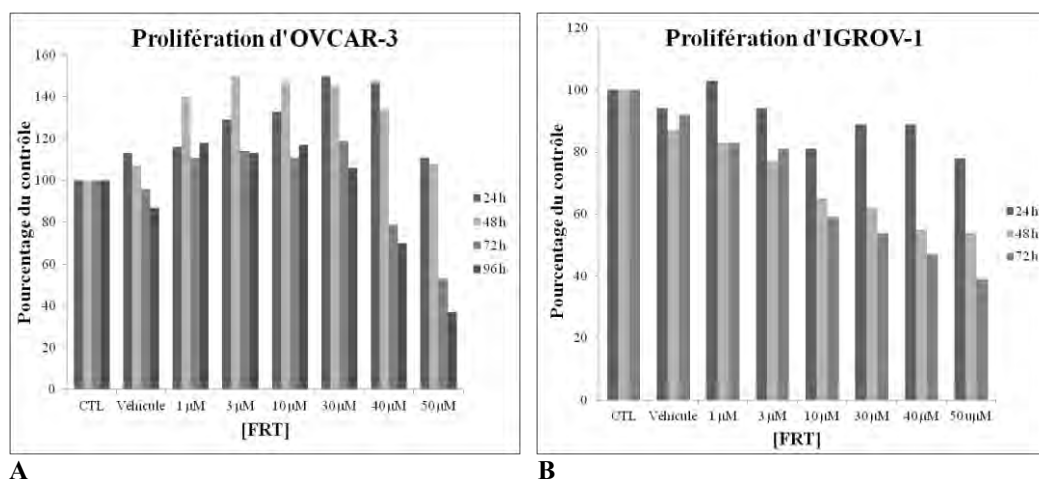
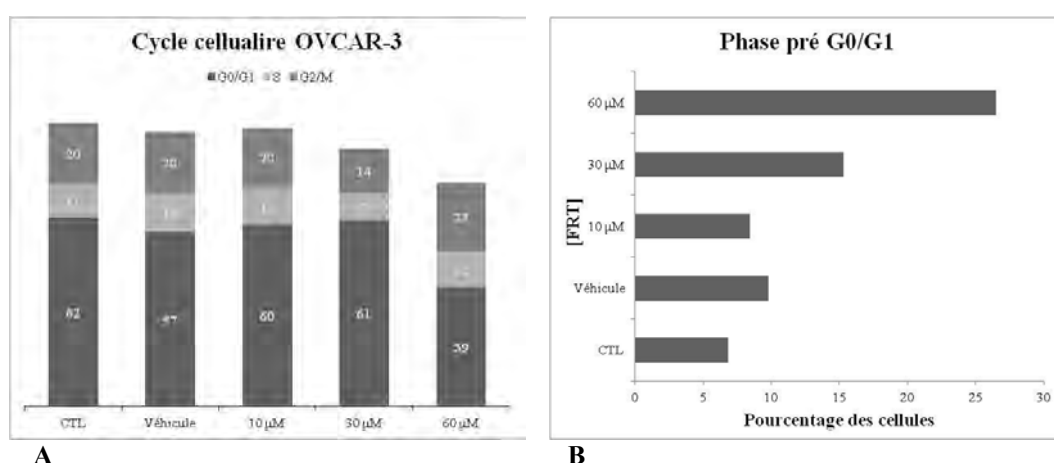


Figure 104 : Prolifération cellulaire des lignées (A) OVCAR-3 et (B) IGROV-1 exprimée en pourcentage du contrôle suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations pour 24 h, 48 h et 72 h (96 h pour OVCAR-3). Le traitement a été effectué après 24 h d'ensemencement des cellules à raison de 8000 cellules/puits pour OVCAR-3, et de 5000 cellules/puits pour IGROV-1 dans une plaque de 96 puits. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 595 nm. Les valeurs représentent les valeurs de l'expérience n=1.

Les résultats ci-dessus sont conformes à ceux obtenus par le bleu de Trypan.

V.2.2 La férutinine induit une accumulation des cellules au niveau de la phase pré G0/G1 du cycle cellulaire

L'effet de la férutinine sur la distribution des cellules dans le cycle cellulaire a été évalué après 72 h de traitement. Les résultats sont représentés dans les graphes ci dessous.



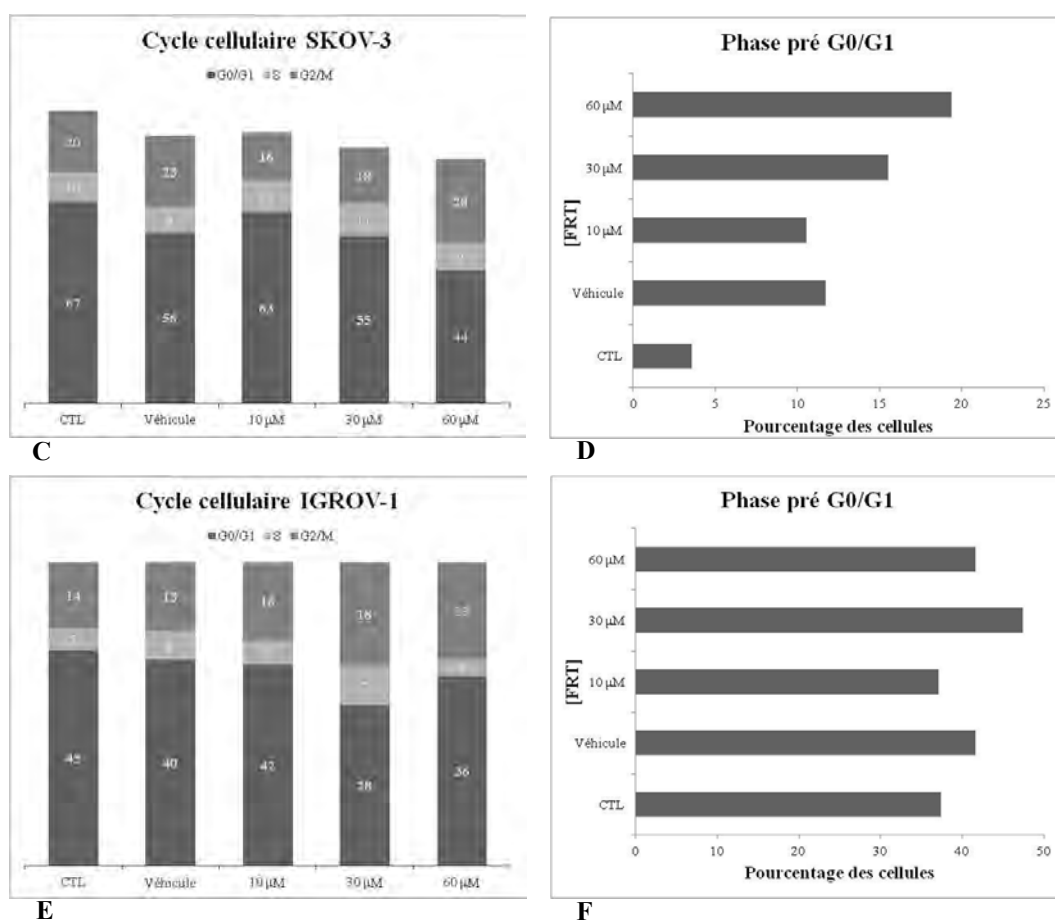


Figure 105 : Analyse de la progression du cycle cellulaire des lignées cellulaires ovariennes traitées par la férutinine à différentes concentrations (A, C et E). (B, D et F) Répartition des cellules dans la phase pré G0/G1. Les cellules ont été traitées par la férutinine à des concentrations de 10, 30 et 60 μ M pendant 72 h. La distribution cellulaire dans les différentes phases du cycle cellulaire a été évaluée par cytométrie de flux après marquage à l'iodure de propidium. Les valeurs représentent les valeurs de l'expérience n=1.

Les graphes de la Figure 105 montrent que la férutinine induit une accumulation cellulaire au niveau de la phase pré G0/G1 dans les trois lignées cellulaires étudiées. Néanmoins, dans la lignée SKOV-3, un léger arrêt du cycle cellulaire a été observé dans la phase G2/M, ce qui explique partiellement l'effet cytostatique de la molécule observé pour cette lignée (aucun changement observé auparavant avec le test au bleu de Trypan).

V.2.3 La férutinine cible la population des cellules souches/progénitrices dans les cellules cancéreuses ovariennes

Le test de formation des sphères en culture 3D a été utilisé pour évaluer la capacité de la férutinine à inhiber ou à enrichir la population des CSC ovarienne.

Trois concentrations de férutinine (3, 10 et 30 μM) ont été appliquées sur les cellules SKOV-3, OVCAR-3 et IGROV-1 en culture. Après 15 jours de culture, la formation des sphères a été évaluée par le calcul de l'UFS.

Dans un premier temps, l'effet de la férutinine sur la formation des sphères à partir de la lignée SKOV-3 a été analysé (Figure 106).

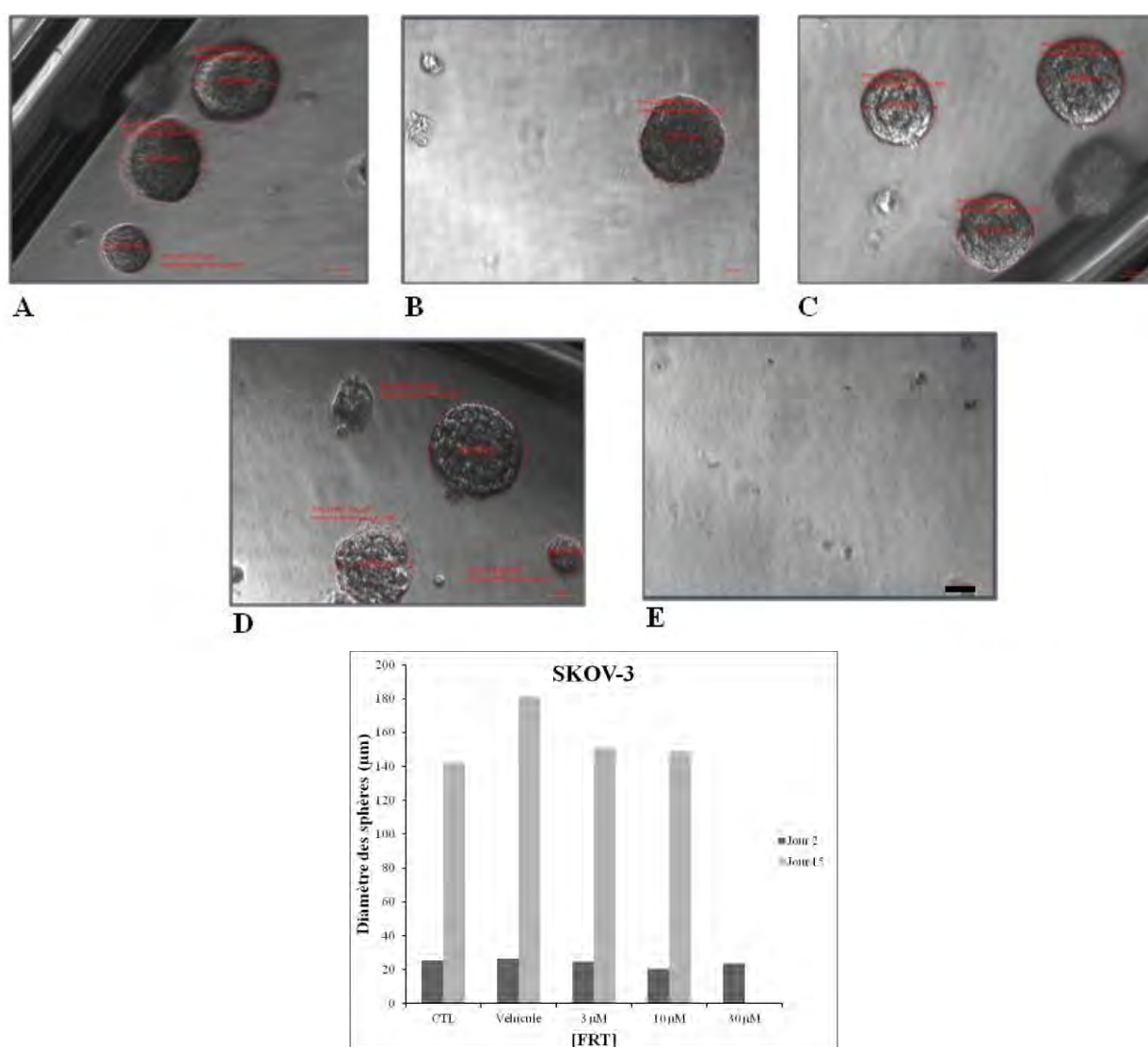


Figure 106 : Taille des sphères dérivées de la lignée cancéreuse ovarienne SKOV-3 suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations. (A) CTL, (B) Véhicule, (C) FRT 3 μM , (D) FRT 10 μM et (E) FRT 30 μM . L'histogramme représente le diamètre des sphères des cellules SKOV-3. Les photos sont prises sous microscope optique. Barre d'échelle, 50 μm .

Les résultats montrent que la valeur d'UFS chez les cellules SKOV-3 reste inchangée à des basses concentrations en férutinine (3 et 10 μM) alors qu'une inhibition complète des sphères a été observée à des concentrations plus élevées (30 μM , UFS= 0). En ce qui concerne les

diamètres des sphères, aucun changement n'a été observé chez les cellules SKOV-3 (Figure 106).

L'effet de la férutinine sur la formation des sphères à partir de la lignée OVCAR-3 a été étudié (Figure 107).

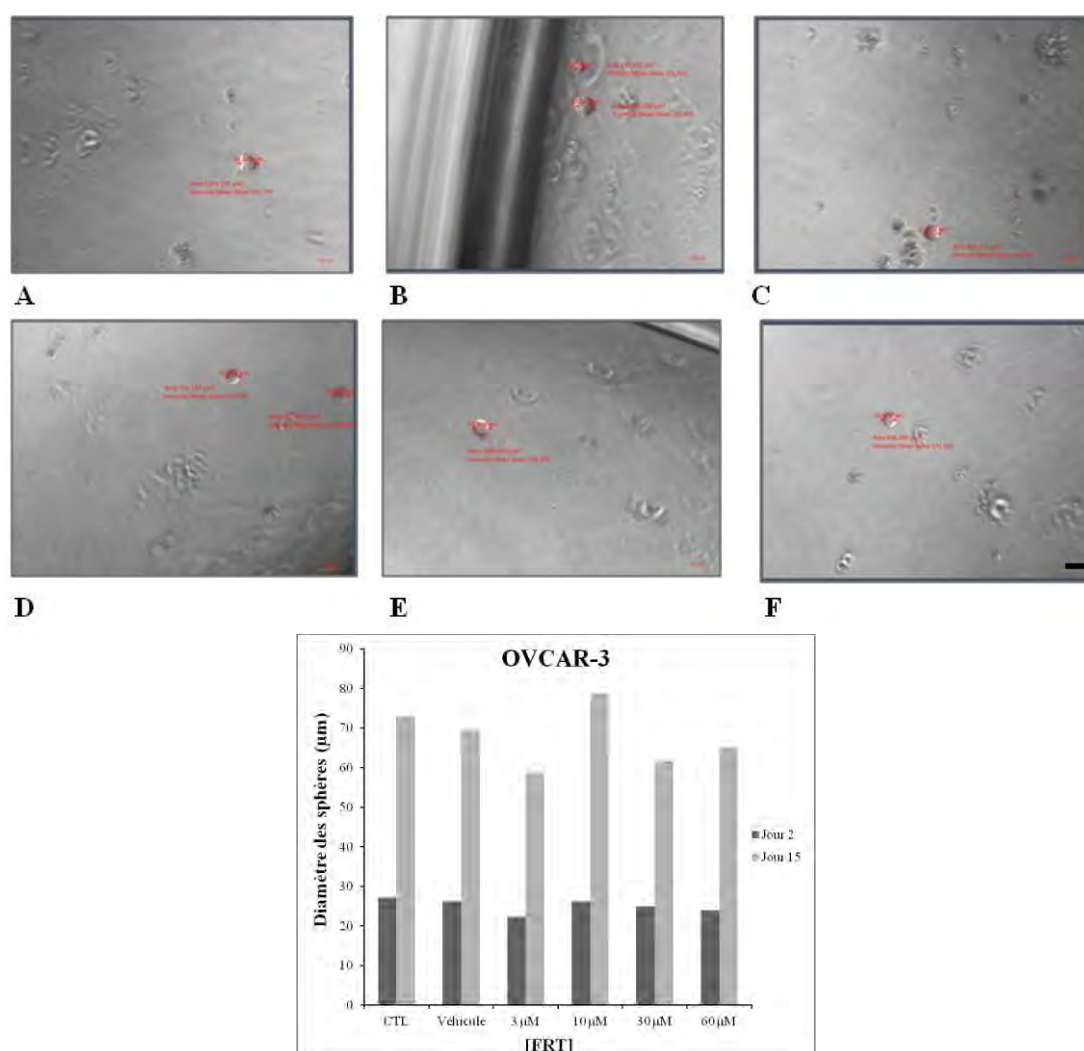


Figure 107 : Taille des sphères dérivées de la lignée cellulaire OVCAR-3 suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations. (A) CTL, (B) Véhicule, (C) FRT 3 μM , (D) FRT 10 μM , (E) FRT 30 μM et (F) FRT 60 μM . L'histogramme représente le diamètre des sphères des cellules OVCAR-3. Les photos sont prises sous microscope optique. Barre d'échelle, 50 μm .

Les résultats montrent que même avec une concentration de 60 μM de férutinine, la valeur d'UFS est réduite de 70% chez les cellules OVCAR-3. En ce qui concerne les diamètres des sphères, aucun changement n'a été observé dans le cas de lignée cellulaire OVCAR-3 (Figure 107).

En 3D, le pouvoir antiprolifératif de la férutinine est plus accentué sur la lignée SKOV-3 que sur la lignée OVCAR-3 en comparaison avec les résultats en 2D.

L'effet de la férutinine sur la formation des sphères à partir de la lignée IGROV-1 a été analysé (Figure 108).

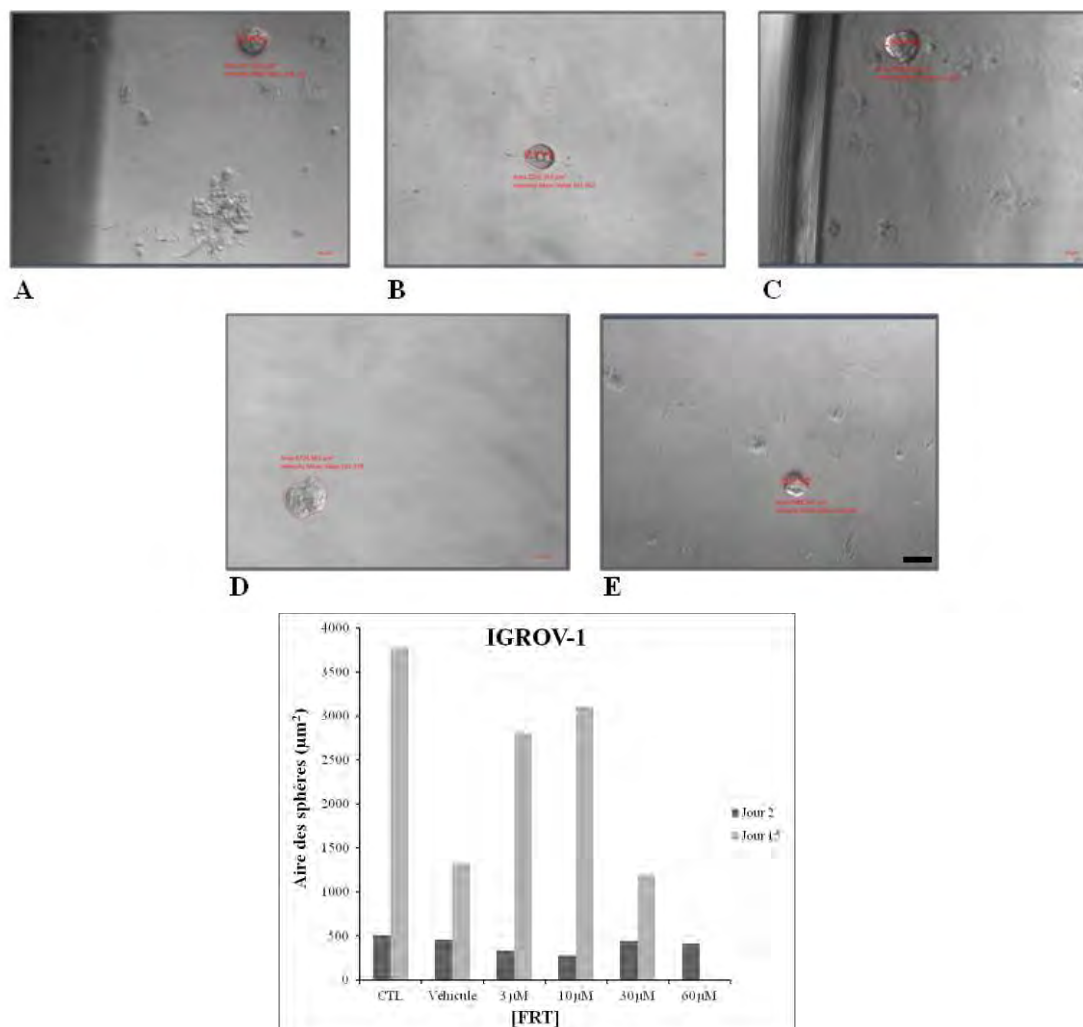


Figure 108 : Taille des sphères dérivées de la lignée ovarienne IGROV-1 suite au traitement par la férutinine à différentes concentrations. (A) CTL, (B) Véhicule, (C) FRT 3 μ M, (D) FRT 10 μ M et (E) FRT 30 μ M. L'histogramme représente l'aire des sphères des cellules IGROV-1. Les photos sont prises sous microscope optique. Barre d'échelle, 50 μ m.

Les résultats de la Figure 108 montrent que la férutinine induit une inhibition dose-dépendante chez les cellules IGROV-1. En effet, l'inhibition de l'UFS augmente de 25 % à 60 % puis de 95 % à 100 % en augmentant la concentration de la férutinine de 3 à 10 μ M puis de 30 à 60 μ M, respectivement. De plus, l'aire de sphères issues des cellules IGROV-1 traitées par la férutinine diminue d'une façon dose-dépendante. L'aire des sphères est aussi diminuée avec la condition véhicule d'une façon comparable avec le traitement avec 30 μ M de la

férutinine. Ces résultats montrent que la férutinine cible probablement une population spécifique des progénitrices qui sont plus différenciées chez la lignée cellulaire IGROV-1.

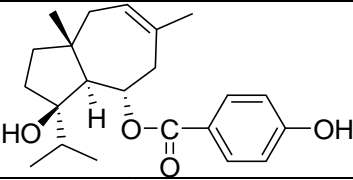
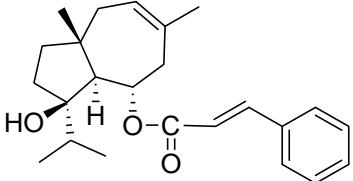
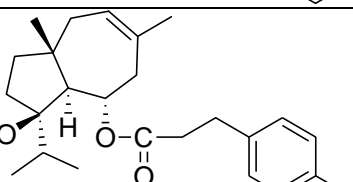
En conclusion, le pouvoir antiprolifératif de la molécule était le plus accentué sur la lignée SKOV-3 > IGROV-1 > OVCAR-3.

Ce screening de l'effet de la férutinine sur les cellules souches cancéreuses ovariennes reste préliminaire puisque la population obtenue après 15 jours de culture est un mélange de sous-populations. Dans ce cadre, des propagations de ces cellules sont cruciales (au moins n= 5) pour évaluer l'effet de la férutinine uniquement sur les CSC.

V.2.4 L'analogue **2b** est le candidat potentiel pour le traitement du cancer ovarien

Les analogues de la férutinine **2c'** et **3c'** actives sur les lignées cellulaires du sein ont été évalués pour leur effet cytotoxique sur les cellules ovariennes. Pour établir les relations structures-activités, le composé **2b** est ajouté à ces deux composés. La viabilité des trois lignées cellulaires a été évaluée en présence de ces analogues pendant trois intervalles de temps (24 h, 48 h et 72 h). Les résultats de l'activité cytotoxique de la férutinine après 72 h de traitement figurent dans le Tableau 38 ci-dessous.

Tableau 38 : Valeurs des CI_{50} des trois produits synthétisés sur les trois lignées cellulaires cancéreuses ovariennes. Les résultats représentent la moyenne de deux expériences différentes par le test au bleu de Trypan, 72 h post-traitement.

Produits	Structures	Lignées cellulaires CI_{50} (μ M)		
		OVCAR-3	SKOV-3	IGROV-1
Férutinine		50	40	39
2b		14	47	39
3c'		20	>50	45

2c'		30	45	40
------------	--	-----------	-----------	-----------

Le Tableau 27 montre que parmi les trois composés testés, les analogues **2b** et **3c'** possèdent le pouvoir cytotoxique le plus accentué sur la lignée OVCAR-3. En effet, le composé **2b** ($CI_{50} = 14 \mu M$) est le plus actif. Il améliore de 3,5 fois l'effet de la férutinine. Le composé **3c'** ($CI_{50} = 20 \mu M$) est moins actif que l'analogue **2b** mais il est 2,5 fois plus actif que la férutinine. Une comparaison structure-activité de **2b** et **3c'** indique que la fonction hydroxyle n'est pas cruciale pour leur activité antiproliférative. Pour accéder à des conclusions plus claires concernant le rôle de la saturation, il serait intéressant de tester l'activité cytotoxique du composé hémisynthétique **3b** (analogue saturé de **2b**) sur la lignée OVCAR-3. La possibilité que l'effet de ces deux composés passe par les REs est faible parce que la lignée OVCAR-3 exprime faiblement les récepteurs aux œstrogènes en comparaison avec la lignée MCF-7 (Annexe-3). Des investigations supplémentaires sur le mécanisme d'action de ces deux analogues seraient nécessaires. Les trois composés testés n'ont montré aucune activité antiproliférative intéressante sur les lignées SKOV-3 et IGROV-1.

Le cancer des ovaires et du sein possèdent plusieurs caractéristiques pathologiques et thérapeutiques en commun. Par exemple, les gènes BRCA1 et BRCA2 qui sont connus comme des gènes de susceptibilité du cancer du sein sont corrélés aussi avec un risque élevé de cancer des ovaires. Ajoutons à cela que les médicaments anticancéreux utilisés pour traiter le cancer du sein, comme le tamoxifène, ont montré une grande importance dans l'intervention clinique du cancer des ovaires. La férutinine est moins active sur l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses ovariennes en comparaison avec celles du sein. De plus, les analogues qui ont montré une activité remarquable sont différents dans les deux types de cancers. Ceci suggère que le rôle de la férutinine et de ses analogues dans la cancérogénèse du sein et de l'ovaire pourrait différent.

V.3 Conclusions

La férutinine possède une activité antiproliférative relativement faible vis-à-vis des lignées cellulaires prostatiques et ovariennes. Elle induit une accumulation des cellules au niveau de

la phase pré G0/G1 du cycle cellulaire, ce qui confirme son effet cytotoxique. L'importance de la férutinine réside dans sa capacité à inhiber sélectivement les cellules souches/progénitrices issues des deux types de cancers hormono-dépendants. Deux analogues ont été sélectionnés par cette étude en tant que candidats anticancéreux pour le traitement du cancer prostatique (**2c'**) et ovarien (**2b**). Ces composés constitueront une future plateforme de recherche intéressante. Le composé **2c'** a été sélectionné par le filtre *in silico* défini dans le chapitre 2.

VI Conclusion générale et perspectives

L'enjeu principal de ce travail de thèse était de trouver une ou plusieurs molécule(s) à propriété (s) anticancéreuse (s), analogues de la férutinine et dotée (s) d'une meilleur activité envers des cancers hormono-dépendants. L'étude menée durant la thèse s'est faite en trois phases.

Dans la première phase, nous avons généré un filtre *in silico* de chimiothèques d'antagonistes potentiels des REs. Les résultats d'arrimage moléculaire de la férutinine dans le site actif des REs ont confirmé structuralement sa double compétence œstrogénique (agoniste/antagoniste) observée *in vitro*. Nous avons mis en évidence que pour designer des antagonistes potentiels, il fallait augmenter la taille de la molécule et occuper la poche C du site de liaison, ce qui nous a amenés à définir une liste d'analogues à étudier.

Dans un deuxième temps, nous avons optimisé de 10% la production de la férutinine à partir de l'huile brute issue des plantes libanaises. Ensuite, nous avons préparé une douzaine d'analogues de la férutinine conservant la partie daucane du produit naturel. Les différents composés ont été obtenus par hémisynthèse à partir du jaeckeanadiol qui est estérifié par différents acides.

Dans la troisième partie de ce projet, nous avons évalué l'activité anticancéreuse de la férutinine et de ses analogues, à savoir leurs effets antiprolifératifs et mécanistiques sur des lignées cellulaires hormono-sensibles. Nous avons démontré que la férutinine avait un pouvoir inhibiteur sur la viabilité des cellules cancéreuses du sein, de la prostate et des ovaires. Nous avons aussi pu mettre en évidence le pouvoir qu'elle avait de cibler les CSCs dans le cas des différentes lignées de cancer étudiées ce qui ouvre de nouvelles perspectives dans le développement de thérapies plus efficaces. Nous avons sélectionnés deux analogues possédant une meilleure activité que la férutinine sur l'inhibition des lignées cellulaires cancéreuses du sein, et deux analogues plus actifs vis-à-vis des lignées cancéreuses prostatiques et ovariennes. Ce travail nous a permis de montrer que l'un des intérêts principaux du rôle joué par les analogues de la férutinine dans la biologie du cancer réside dans leur capacité à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses du sein tout en restant non toxiques pour les cellules normales. Cela constitue un avantage par rapport aux effets secondaires des agents chimio-thérapeutiques standards.

Au bilan, l'analogue **3c'**, 30 fois plus actifs en terme de cytotoxicité que la férutinine sur la lignée MCF-7, représentant la fraction du cancer du sein exprimant les REs, ressort de cette évaluation biologique. Ce composé a été de même sélectionné comme antagoniste potentiel par l'étude d'arrimage moléculaire sur les récepteurs ce qui en valide le filtre *in silico* mis au point. Désormais, nous disposons d'un système de calcul capable de mener un criblage virtuel pour sélectionner les antagonistes potentiels des REs quelle que soit leur origine (synthétique ou naturelle).

L'analogue **3c'** diffère de la férutinine par la présence de deux carbones supplémentaires au niveau de la liaison ester. Il serait intéressant comme perspective de voir comment se modifierait l'activité si on étudiait une nouvelle série modifiant ce paramètre d'élongation de la chaîne reliant le noyau phényle au cœur sesquiterpénique.

D'un point de vue, strictement biologique, il serait intéressant de compléter cette étude par l'évaluation de la férutinine et de ses analogues sur le cancer de l'endomètre, un autre exemple de cancer hormono-dépendant. En effet, l'une des limitations de la thérapie avec le tamoxifène réside dans ses activités agonistes au niveau de l'endomètre favorisant l'initiation d'un cancer secondaire. Nazruallev *et al.*, ont évalué l'effet de l'administration de la férutinine sur la masse de l'endomètre des souris ayant subi une ovariectomie. Les résultats ont montré que la molécule augmente la masse utérine d'une façon identique au diéthylstilbestrol (le remplaçant synthétique des œstrogènes) (Nazrullaev SS *et al.*, 2008). Ceci indique que la férutinine est capable de moduler la prolifération des cellules endométriales, ce qui met en relief son implication dans le cancer. Les lignées cellulaires RL95-2 et Ishikawa constituent un point de départ de l'étude. Toutefois, il est important de souligner que les œstrogènes ne sont pas le seul facteur déterminant dans la cancérogenèse hormono-dépendante. Il existe d'autres hormones comme les androgènes ou/et les progestérones dont l'implication est aussi importante que celle des œstrogènes. A cette échelle, la férutinine pourrait moduler leur effet ou même entrer en compétition quant à leur liaison aux récepteurs. L'étude globale du niveau d'expression de chaque récepteur et de leur fonctionnement en présence de la férutinine pourrait apporter de nouveaux éléments. L'appui de la détermination du statut hormonal aboutira à une meilleure prise en charge du cancer chez les patients.

Récemment, la férutinine a attiré l'attention des chercheurs pour sa fonction œstrogénique en tant que remède naturel du traitement hormonal chez les femmes ménopausées souffrant d'ostéoporose (Zavatti M *et al.*, 2013). Dans les pays du Moyen Orient, cette même fonction conduit à l'utilisation de la férutinine pour des raisons aphrodisiaques. Il serait intéressant de mener une étude statistique sur les consommateurs

d'extrait de *F. hermonis*, dans le but d'évaluer leur statut hormonal et leur susceptibilité aux cancers hormono-dépendants.

Une étude *in vivo* de l'activité de la férutinine et de ses analogues actifs, sera nécessaire pour confirmer les résultats obtenus *in vitro*. Cette étude nécessite d'établir un modèle convenable du cancer du sein *in vivo* qui pourrait être sur des souris immunodéficientes. Ensuite, la démarche des expériences comprendrait deux principales étapes :

- l'évaluation de la toxicité systémique générale de la férutinine et de ses analogues actifs **2c'**, **3c'** et **3b** (étude pilote sur le taux de survie des souris),
- l'analyse des divers marqueurs au niveau du foyer primaire et secondaire du cancer.

Finalement, si l'intérêt de la férutinine et de ses analogues actifs était confirmé par une étude complète, il serait intéressant de pouvoir considérer les analogues des chefs de fils de synthèses plus ciblées. Les résultats offrent une nouvelle piste à partir de laquelle une stratégie innovatrice de traitement contre des cancers jusqu'ici incurables pourrait être développée. De plus, cela ouvrira la voie à de nouvelles options de thérapie personnalisée basées sur l'inhibition sélective des récepteurs aux œstrogènes préférentiellement impliqués dans le développement tumoral.

VII Partie expérimentale

Matériel végétal et extraction :

La récolte des racines de *Ferula hermonis* a été faite en mai 2010 au Mont Hermon au Sud du Liban.

Les racines séchées et broyées ont été extraites par une méthode d'extraction de routine:

1. Les racines de *Ferula hermonis* (17g) sont extraites par le dichlorométhane (250 ml) dans un appareil de Soxhlet,
2. L'extrait est concentré sous vide et à température ambiante pour obtenir une huile visqueuse (4,5 g, 27 %).

Cette huile est stockée à température ambiante, à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

Synthèses :

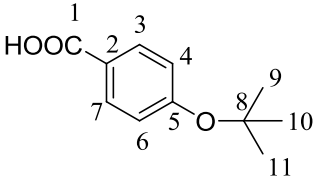
Toutes les réactions nécessitant des conditions anhydres ont été réalisées avec des solvants distillés.

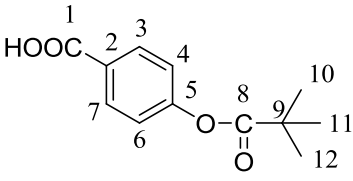
Les réactions sont suivies par CCM (plaques de silice Merck silica gel 60F254). Les rapports frontaux (Rf) ont été donnés dans les conditions où s'est effectuée la flash-chromatographie. Les plaques de chromatographie ont été révélées sous lampe UV (254 nm) et/ou par chauffage après immersion dans une solution d'acide phosphomolybdique à 10 % dans l'éthanol.

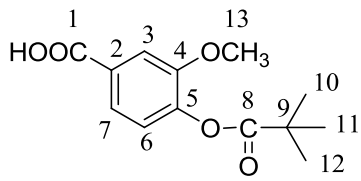
Les chromatographies 'flash' ont été réalisées avec un gel de silice SDS 15-40µm. Les analyses RMN ont été obtenues avec des spectromètres Bruker Advance 300 et Advance 500 fonctionnant à 300 et 500 MHz respectivement pour les analyses RMN ^1H et 75 et 125 MHz pour les analyses ^{13}C .

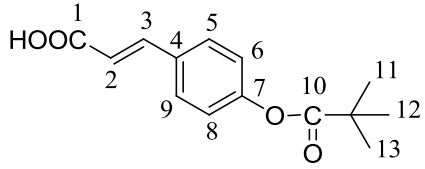
Les déplacements chimiques sont donnés en partie par millions (ppm) par rapport au solvant deutéré considéré comme référence interne. Les constantes de couplage sont données en Hertz (Hz). Les spectres infra-rouge (IR) ont été enregistrés sur un appareil Perkin-Elmer FT-IR 1725X. Les spectres de masse ont été obtenus grâce à un spectromètre ThermoQuest TSQ 7000. Les spectres de masse haute résolution ont été enregistrés sur un spectromètre ThermoFinnigan MAT 95 XL.

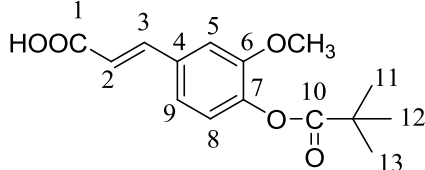
Les abréviations des données pour la RMN sont les suivantes: s (singulet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet), dd (doublet dédoublé), ddd (doublet dédoublé dédoublé), td (triplet dédoublé).

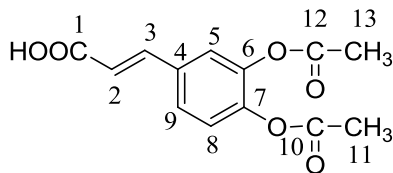
4a [13205-47-5]	Acide 4-(1,1-diméthyléthoxy) benzoïque
	$C_{11}H_{14}O_3$
MM= 194,23 g/mol	
<p>Une suspension d'hydruide de sodium (0,65 g, 16,2 mmol) dans le DMSO (7 ml) est chauffée à 70°C sous argon durant 1 h. La solution est refroidie à 30°C puis du <i>tert</i>-butanol (1 ml, 1,01 mmol) est ajouté progressivement. Le mélange est laissé sous agitation pendant 30 min puis du <i>p</i>-fluorobenzonitrile (1,2 g, 9,9 mmol) est ajouté. La solution est laissée sous agitation pendant la nuit. On chauffe ensuite à 60°C pendant 6 h. Après refroidissement, la solution est diluée avec de l'Et₂O (70 ml). La solution est lavée avec une solution saturée de NaCl, séchée sur MgSO₄ et évaporée pour donner 1,2 g d'huile. Cette huile est portée à reflux pendant la nuit avec du NaOH 2N (5 ml) dans de l'éthanol (20 ml). Le mélange est ensuite concentré, dissous dans de l'eau (30 ml) puis lavé avec du diéther. La phase aqueuse est acidifiée avec du HCl 2N puis extraite avec du CH₂Cl₂. Les fractions organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ puis évaporées pour donner l'acide protégé attendu sous forme d'une poudre blanche (1,16 g, 59%) (Nadelson J <i>et al.</i>, 1995).</p>	
RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃): δ 8,03 (2H, d, J= 6,9 Hz, H3/H7), 7,05 (2H, d, J= 6.6 Hz, H4/H6), 1,43 (9H, s, H9-H11).	
MS (DCI-NH ₃): [MNH ₄] ⁺ = 213,1	

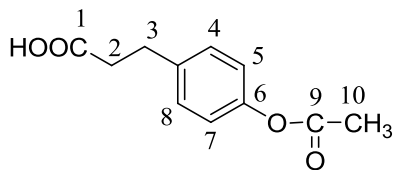
4b [86068-43-1]	Acide <i>p</i>-pivaloyloxybenzoïque
	$C_{12}H_{14}O_4$
MM= 222,24 g/mol	
<p>A une solution d'acide <i>p</i>-hydroxybenzoïque (1,15 g, 829 mmol) dans la pyridine (11,5 ml) à T<5°C (bain de glace) est ajouté le DMAP (0,3 g, 249 mmol) et le chlorure de pivaloyle (3g, 3 ml, 24,8 mol). La solution est laissée sous agitation pendant 2h, de l'eau distillée (23 ml) est ajoutée et l'agitation maintenue 3h supplémentaires. La solution est extraite avec le dichlorométhane (3 x 8 ml). Les phases organiques collectées sont lavées ensuite avec du H₂SO₄ 2M (4 x 8 ml) et une solution saturée de NaCl (12 ml) puis séchées sur MgSO₄. Le brut obtenu est trituré avec de l'éther de pétrole (3 x 4 ml) pour donner le produit attendu sous la forme d'une poudre blanche (1,28 g, 70%).</p>	
RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃): δ 8,16 (2H, d, J= 8,7 Hz, H3/H7), 7,21 (2H, d, J= 8,7 Hz, H4/H6), 1,41 (9H, s, H10-H12).	
MS (DCI-NH ₃): [MNH ₄] ⁺ = 240,1	

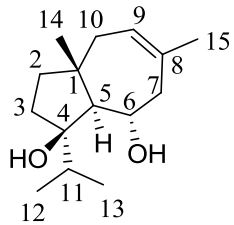
4d	Acide 3-methoxy-4-(pivaloyloxy) benzoïque
	$C_{13}H_{16}O_5$
MM= 252,26 g/mol	
même protocole que l'acide 4b impliquant, l'acide vanilique (4-hydroxy-3-methoxy benzoïque) (140 mg, 829 mmol), le DMAP (30,3 mg, 249 mmol) et le chlorure de pivaloyle (3g, 0,3 ml, 2,48 mol).	
Le produit obtenu est une poudre blanche (206 mg, rendement quantitatif).	
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7,72 (1H, dd, J= 3 Hz et J= 9 Hz, H7), 7,66 (1H, d, J= 3 Hz, H3), 7,08 (1H, d, J= 6 Hz, H6), 3,86 (3H, s, H13), 1,37 (9H, s, H10-H12).	

5c	Acide (E)-3-(4-(pivaloyloxy) phenyl) acrylique
	$C_{14}H_{16}O_4$
MM= 248,27 g/mol	
même protocole que pour l'acide 4b impliquant, l'acide coumarique (4-hydroxycinnamique) (136 mg, 829 mmol), le DMAP (30,3 mg, 249 mmol) et le chlorure de pivaloyle (3g, 0,3 ml, 2,48 mol).	
Le produit obtenu est une poudre blanche (182 mg, 88%).	
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7,75 (1H, d, J= 15 Hz, H3), 7,56 (2H, d, J= 9Hz, H5/H9), 7,10 (2H, d, J= 9 Hz, H6/H8), 6,4 (1H, d, J= 18 Hz, H2), 1,36 (9H, s, H12-H14).	

5d	Acide (E)-3-(3-methoxy-4-(pivaloyloxy) phenyl) acrilique
	$C_{15}H_{18}O_5$
MM= 278,30 g/mol	
même protocole que pour l'acide 4b impliquant, l'acide ferulique ((E)-3-(4-hydroxy-3-méthoxyphenyl) acrilique) (1,63 g, 829 mmol), le DMAP (30,3 mg, 249 mmol) et le chlorure de pivaloyle (3g, 3 ml, 2,48 mol).	
Le produit obtenu est une poudre blanche (1,77 g, 77%).	
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ 7,77 (1H, d, J= 15,9 Hz, H2), 7,20 (1H, d, J= 6 Hz, H5), 7,17	

(1H, dd, J= 8,4 Hz et J= 1,8 Hz), 7,08 (1H, d, J= 8,1 Hz, H8), 6,43 (1H, d, J= 15 Hz, H3), 3,89 (3H, s, H15), 1,41 (9H, s, H12-H14).	
5e [88623-81-8]	Acide (E)-3-(3,4-diacetoxyphenyl) acrylique
	C ₁₃ H ₁₂ O ₆
MM= 264,23 g/mol	
même protocole que pour l'acide 6c, impliquant l'acide caféique (2 mmol). L'acide protégé obtenu est un solide blanc (161 mg, 30%).	
RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃): δ 7,59 (1H, d, J= 15,9 Hz, H2), 7,33 (1H, d, J= 8,4 Hz, H5), 7,64 (1H, d, J= 2,1 Hz, H8), 7,67 (1H, d, J= 3 Hz, H9), 6,56 (1H, d, J=16,2 Hz, H3), 2,31 (6H, d, J= 2,4 Hz, H13/H14).	
SM (DCI-CH ₄): [MH] ⁺ : 283,0	

6c [7249-16-3]	Acide 3-(4-acetoxyphenyl) propanoïque
	C ₁₁ H ₁₂ O ₄
MM= 208,21 g/mol	
A une solution d'acide 3-(p-hydroxyphenyl) propanoïque (166 mg, 1 mmol) dans la pyridine (2 ml) est ajouté de l'anhydride acétique (2 ml). Le mélange est laissé sous agitation pendant la nuit. Ensuite, le milieu réactionnel est hydrolysé par une solution saturée de NaHCO ₃ (3 ml) puis extrait par le dichlorométhane (3 x 3 ml). Les phases organiques sont lavées avec de l'eau distillée (4 x 3 ml) puis séchées sur MgSO ₄ et le solvant est évaporé pour donner l'acide protégé sous forme d'un solide blanc (80 mg, 40%).	
RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃): δ 10,79 (1H, br s, OH), 7,25 (2H, d, J= ,8,7 Hz, H5/H9), 7,04 (2H, d, J= 8,4 Hz, H6/H8), 2,99 (2H, td, J=15,6 Hz et J= 7,8 Hz, H3), 2,70 (2H, td, J= 15,3 Hz et J= 7,2 Hz, H4), 2,32 (3H, s, H11).	

	Jaeshkenadiol
	C ₁₅ H ₂₆ O ₂
1-isopropyl-3a, 6 diméthyl-1, 2, 3, 3a, 4, 7, 8, 8a-octahydroazulène-1,8-diol	
MM=238,37 g/mol	
A 1g d'huile brute de <i>ferula hermonis</i> est ajouté 50 ml d'une solution de KOH (10% dans du	

méthanol). La solution est portée à reflux à pendant 1h. Après refroidissement, le méthanol est évaporé. Le brut obtenu est repris dans une solution de HCl 1M (40 ml) et cette solution est extraite au dichlorométhane (3 x 50 ml). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de NaCl (70 ml), séchées sur MgSO₄ et concentrées.

Après purification par flash chromatographie (EP/AcOEt 8 : 2), on obtient le jaeschkenadiol sous forme d'un solide blanc cristallin (417 mg rendement 41%, R_f= 0,26).

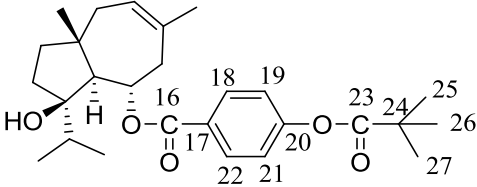
RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ 5,44 (1H, br s, H9), 3,91 (1H, td, J=2,5 Hz et J= 12,5 Hz, H6), 2,31 (1H, br t, H10), 2,18 (1H, dd, J= 3Hz et J= 14,5 Hz, H10), 2,10 (1H, sept, J= 6,5 Hz, H11), 1,96 (1H, dd, J= 6Hz et J= 14,5 Hz, H3), 1,93 (1H, dd, J= 8 Hz et J= 14 Hz, H2), 1,80-1,83 (1H, m, H3), 1,76 (3H, s, H14), 1,66 (1H,d, J= 10,5 Hz, H5), 1,55 (1H, td, J= 8 Hz et J= 14 Hz, H2), 1,42 (1H, dd, J= 7,5 Hz et J= 12,5 Hz, H7), 1,16 (1H, ddd, J= 8,5 Hz et J= 12,5 Hz, H7), 0,97 (3H, s, H15), 0,92 (3H, d, J= 7 Hz, H12), 0,88 (3H, d, J= 7 Hz, H13).

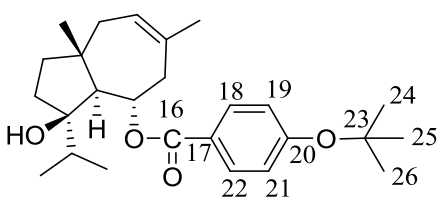
Tous ces protons du jaeschkenadiol constituent la partie DAUCANE qui sera retrouvée dans tous les analogues.

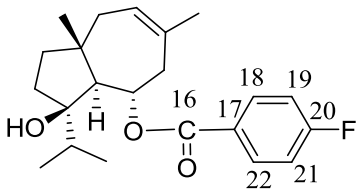
RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 17,6 (C12), 18,6 (C13), 20,2 (C15), 26,4 (C14), 31,4 (C2), 37,0 (C11), 40,9 (C3), 41,2 (C7), 41,4 (C1), 44,1 (C10), 60,1 (C5), 71,3 (C6), 87,1 (C4), 125,3 (C9), 133,5 (C8).

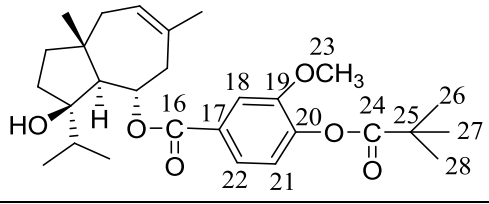
IR: 3337, 1723, 1663 cm⁻¹

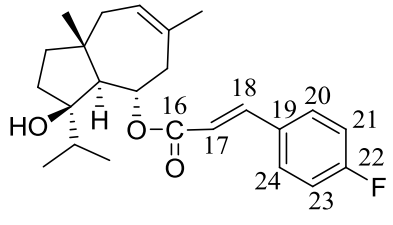
HRMS (DCI-CH₄) [MH⁺ - H₂O] calculée pour C₁₅H₂₅O: 222,1905, trouvée: 221,1917

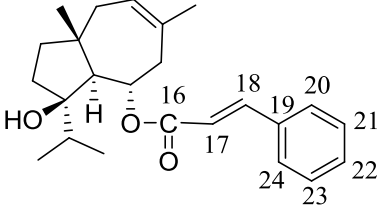
<p>1b</p> 	<p>C₂₇H₃₈O₅</p> <p>3-hydroxy-3-isopropyl-6, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yl 4-(pivaloyloxy) benzoate</p>
MM=442,59 g/mol	
<p>A une solution de jaeschkenadiol (50 mg, 0.209 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (3 ml) est ajoutée de l'acide p-pivaloyloxybenzoïque (65 mg, 0,293 mmol) et du DMAP (8 mg, 0,063 mmol). La solution est laissée sous agitation pendant 10 min puis le DCC (80 mg, 0,376 mmol) est ajoutée. Le mélange est laissé sous agitation pendant 2h supplémentaires à température ambiante. Le mélange est dilué avec de l'acétonitrile (5 ml) puis filtrée. Les phases organiques sont extraites avec une solution saturée de Na₂CO₃ 10% (2 x 3 ml) puis lavées avec une solution saturée de NaCl (3 ml). Le solvant est évaporé. Après purification du mélange par flash chromatographie (EP/AcOEt 9 : 1), on obtient le produit attendu sous forme d'une poudre blanche (90,4 mg, 98%, R_f= 0,32).</p>	
<p>RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): partie DAUCANE + δ 8,04 (2H, d, J= 8,7 Hz, H18, H22), δ 7,16 (2H, d, J= 9 Hz, H19, H21), δ 1,40 (9H, s, tBu, H25, H26, H27).</p>	
<p>RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ 17,5 (C12), 18,5 (C13), 20,2 (C15), 26,5 (C14), 27,1 (C25-C26-C27), 31,8 (C2), 37,3 (C11), 39,2 (C24), 41,0 (C3), 41,3 (C7), 41,3 (C1), 44,0 (C10), 59,9 (C5), 71,6 (C6), 83,3 (C4), 121,7 (C19), 121,8 (C21), 125,3 (C9), 124,0 (C17), 127,8 (C18), 128,2 (C22), 133,6 (C8), 155,0 (C20), 165,9 (C16), 176,6 (C23).</p>	
IR: 3478, 1747, 1755, 1705, 1684, 1604, 1279, 1108 cm ⁻¹	
HRMS (DCI-CH₄) M-H₂O calculée pour C ₂₇ H ₃₇ O ₃ : 425,2692, trouvée: 425,2700	

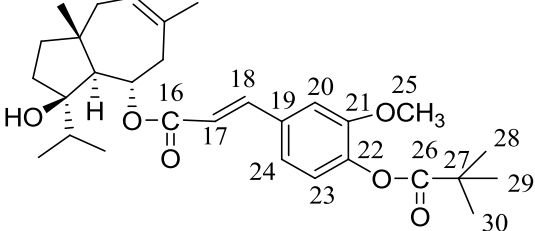
1a 	$C_{26}H_{38}O_4$ 3-hydroxy-3-isopropyl-6, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yl 4-tert-butoxybenzoate
MM=414,58 g/mol	
même protocole que pour le composé 1b, impliquant le jaeschkenadiol (100 mg, 0,419 mmol), l'acide 4(1,1-diméthylethoxy) benzoïque (130 mg, 0,671 mmol), le DMAP (17 mg, 0,126 mmol) et le DCC (154mg, 0,755 mmol). Après purification par flash chromatographie (CH_2Cl_2) on obtient le produit attendu sous forme d'huile (58.6 mg, 35%, Rf= 0,1).	
<u>RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$):</u> partie DAUCANE + δ 7,93 (2H, d, J=8,7 Hz, H19), 7.03 (2H, d, J= 9 Hz, H18), 1.10 (9H, s, tBu, H24, 25, 23).	
<u>RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$):</u> δ 17,5 (C12), 18,6 (C13), 20,2 (C15), 26,5 (C14), 28,9 (C24-C25-C26), 29,8 (C23), 31,7 (C2), 37,3 (C11), 41,0 (C3), 41,3 (C7), 41,4 (C1), 44,0 (C10), 60,1 (C5), 71,1 (C6), 86,4 (C4), 122,4 (C19-C21), 124,5 (C17), 125,2 (C9), 131,0 (C18-C22), 133,6 (C8), 160,4 (C20), 166,5 (C16).	
<u>IR:</u> 3477, 1692, 1603, 1272, 1253, 1154 cm^{-1}	
HRMS (DCI- CH_4) $[M-H]^+$ calculée pour $C_{26}H_{37}O_4$: 397,2743, trouvée: 397,2755	

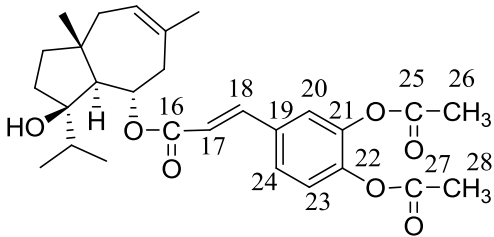
1c 	$C_{22}H_{29}FO_3$ 3-hydroxy-3-isopropyl-6, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yl 4-fluorobenzoate
MM=360,46 g/mol	
même protocole que pour le composé 1b, impliquant le jaeschkenadiol (50 mg, 0,209 mmol), l'acide 4-fluorobenzoïque (41 mg, 0,293 mmol), le DMAP (8 mg, 0,063 mmol) et le DCC (80 mg, 0,376 mmol). Après purification par flash chromatographie (EP/AcOEt 99,5 : 0,5) on obtient le produit attendu sous forme d'un solide amorphe (48.6 mg, 65%, Rf= 0,18).	
<u>RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$):</u> partie DAUCANE + δ 8,04 2d (2H, J= 5,4 Hz et J= 5,4 Hz, H18, H22), 7,13 2d (2H, J= 8,4 Hz et J= 8,4 Hz, H19, H21).	
<u>RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$):</u> δ 17,6 (C12), 18,6 (C13), 20,2 (C15), 26,4 (C14), 31,4 (C2), 37,0 (C11), 40,9 (C3), 41,2 (C7), 41,4 (C1), 44,1 (C10), 60,1 (C5), 71,3 (C6), 87,1 (C4), 115,6 (C21), 115,9 (C19), 125,3 (C9), 126,7 (C17), 132,1 (C22), 132,2 (C18), 133,5 (C8), 165,6 (C16), 165,9 (C20).	
<u>IR:</u> 3513, 1700, 1604, 1469, 1271, 1238 cm^{-1}	
HRMS (DCI- CH_4) $[MH^+ - H_2O]$ calculée pour $C_{22}H_{28}FO_2$: 343,2073, trouvée: 343,2086	

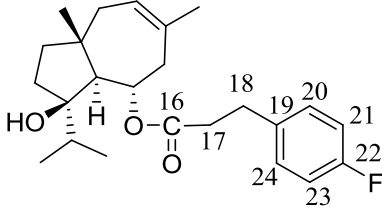
1d	
	$C_{28}H_{40}O_6$ (E)-(3R, 4S, 8aR)- 3-hydroxy-3-isopropyl-6,8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yl 3-methoxy-4-(pivaloyloxy) benzoate
MM=472,61 g/mol	
même protocole que pour le composé 1b, impliquant le jaeschkenadiol (50 mg, 0,209 mmol), l'acide 3-methoxy-4-(pivaloyloxy) benzoïque (73.9 mg, 0,293 mmol), le DMAP (8 mg, 0,063 mmol) et le DCC (80 mg, 0,376 mmol).	
Après purification par flash chromatographie (EP/AcOEt 9 : 1) on obtient le produit attendu sous forme d'un solide amorphe (57 mg, 58%, Rf= 0,15).	
RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): partie DAUCANE + δ 7.61-7.64 (2H, m, H18, H22), 7.07 (1H, d, J= 8.7 Hz, H21), 3.85 (3H, s, OMe, H28), 1.40 (9H, s, tBu, H25, H26, H27).	
RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 17,6 (C12), 18,6 (C13), 20,2 (C15), 26,4 (C14), 27,2 (C26-C27-C28), 31,9 (C2), 32,4 (C25), 37,3 (C11), 41,3 (C3), 41,3 (C7), 41,3 (C1), 44,1 (C10), 56,0 (C23), 60,0 (C5), 71,6 (C6), 86,3 (C4), 113,3 (C18), 122,5 (C22), 124,0 (C21), 125,3 (C9), 128,9 (C17), 133,5 (C8), 144,3 (C20), 151,2 (C19), 165,9 (C16), 176,3 (C24).	
IR: 3514, 1758, 1702, 1604, 1285, 1243, 1200, 1176, 1102 cm^{-1}	
HRMS (DCI- CH_4) $[MH]^+$ calculée pour $C_{28}H_{39}O_6$: 471,2747, trouvée: 471,2744	

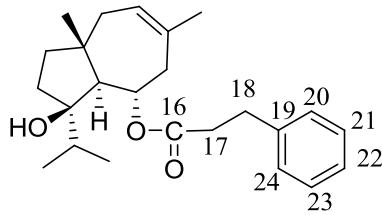
2a	
	$C_{24}H_{31}FO_3$ (E)-(3R, 4S, 8aR)- 3-hydroxy-3-isopropyl-6,8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yl 3-(4-fluorophenyl) acrylate
MM=386,50 g/mol	
même protocole que pour le composé 1b, impliquant le jaeschkenadiol (50 mg, 0,209 mmol), l'acide 4-fluorocinnamique (48.7 mg, 0,293 mmol), le DMAP (8 mg, 0,063 mmol) et le DCC (80 mg, 0,376 mmol).	
Après purification par flash chromatographie (EP/AcOEt 9 : 1) on obtient le produit attendu sous forme d'un solide amorphe (44,8 mg, 55%, Rf= 0,3).	
RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): partie DAUCANE + δ 7,65 (1H, d, J= 16,2 Hz, H18), 7,53 2d (2H, J= 5,4 Hz et J= 5,4 Hz, H20, H24), 6,32 (1H, d, J= 15,9 Hz, H17), 7,09 2d (2H, J= 8,7 Hz et J= 8,7 Hz, H21, H23).	
RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 17,6 (C12), 18,6 (C13), 20,1 (C15), 26,5 (C14), 31,9 (C2), 37,3 (C11), 41,0 (C3), 41,3 (C7), 41,4 (C1), 44,0 (C10), 60,0 (C5), 71,0 (C6), 86,3 (C4), 116,0 (C23), 116,2 (C21), 118,0 (C17), 118,0 (C9), 130,1 (C24), 130,5 (C20), 130,6 (C19), 133,5 (C8), 144,1 (C18), 164,0 (C22), 166,9 (C16).	
IR: 3511, 1699, 1637, 1600, 1452, 1176 cm^{-1}	
HRMS (DCI- CH_4) M-OH calculée pour $C_{24}H_{30}FO_2$: 369,2241, trouvée: 369,2230	

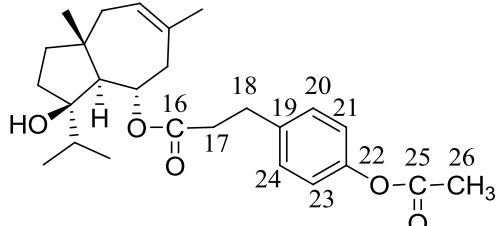
2b 	$C_{24}H_{32}O_3$ 3-hydroxy-3-isopropyl-6, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yl cinnamate
MM=368,51 g/mol	
même protocole que pour le composé 1b, impliquant le jaeschkenadiol (50 mg, 0,209 mmol), l'acide cinnamique (43.5 mg, 0,293 mmol), le DMAP (8 mg, 0,063 mmol) et le DCC (80 mg, 0,376 mmol). Après purification par flash chromatographie (CH_2Cl_2) on obtient le produit attendu sous forme d'un solide amorphe (53 mg, 66%, Rf= 0,2).	
RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): partie DAUCANE + δ 7,70 (1H, d, J= 15,9 Hz), 7,39-7,56 (m, 5H), δ 6,40 (1H, d, J= 15,9 Hz).	
RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 17,6 (C12), 18,6 (C13), 20,1 (C15), 26,5 (C14), 31,8 (C2), 37,3 (C11), 41,0 (C3), 41,3 (C7), 41,4 (C1), 44,0 (C10), 60,1 (C5), 70,9 (C6), 86,4 (C4), 118,2 (C17), 125,2 (C9), 128,3 (C20-C24), 128,9 (C21-C23), 130,5 (C22), 134,3 (C8), 133,6 (C19), 145,5 (C18), 167,1 (C16).	
IR: 3499, 1697, 1636, 1203, 1181 cm^{-1}	
HRMS (DCI- CH_4) $[MH]^+$ calculée pour $C_{24}H_{33}O_3$: 369,2430, trouvée: 369,2440	

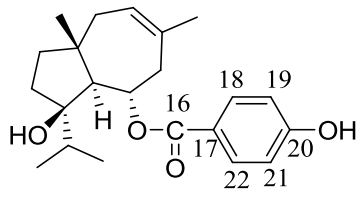
2d 	$C_{30}H_{42}O_6$ (E)-(3R, 4S, 8aR)-3-hydroxy-3-isopropyl-6, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yl 3-(3-methoxy-4-(pivaloyloxy)phenyl)acrylate
MM=498,65 g/mol	
même protocole que pour le composé 1b, impliquant le jaeschkenadiol (50 mg, 0,209 mmol), l'acide (E)-3-(3-methoxy-4-(pivaloyloxy) phenyl) acrique (81,5 mg, 0,293 mmol), le DMAP (8 mg, 0,063 mmol) et le DCC (80 mg, 0,376 mmol). Après purification par flash chromatographie (EP/AcOEt 8,5 : 1,5) on obtient le produit attendu sous forme d'un solide amorphe (64,5 mg, 62%, Rf= 0,16).	
RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): partie DAUCANE + δ 7,65 (1H, d, J= 15,9 Hz, H17), 7,13 (1H, dd, J= 1,8 Hz et J= 8,1 Hz, H24), 7,09 (1H, d, J= 1,8 Hz, H20), 7,03 (1H, d, J= 8,1 Hz, H23), 6,33 (1H, d, J= 15,9 Hz, H17), 3,85 (3H, s, OMe), 1,37 (9Hz, s, tBu, H27, H28, H29).	
RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 17,6 (C12), 18,6 (C13), 20,1 (C15), 27,2 (C14), 26,5 (C28-C29-C30), 31,8 (C2), 37,3 (C11), 41,0 (C3), 40,9 (C27), 41,3 (C7), 41,4 (C1), 44,0 (C10), 56,0 (C25), 60,1 (C5), 71,0 (C6), 86,3 (C4), 111,4 (C20), 118,2 (C17), 121,3 (C24), 132,9 (C9), 123,2 (C23), 132,9 (C19), 133,5 (C8), 142,2 (C22), 144,9 (C18), 151,6 (C21), 167,1 (C16), 176,5 (C26).	
IR: 3415, 1757, 1701, 1637, 1155, 1110 cm^{-1}	
HRMS (DCI- CH_4) $[MH]^+$ calculée pour $C_{30}H_{43}O_6$: 499,3060, trouvée: 499,3048	

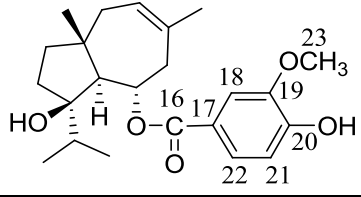
2e 	$C_{28}H_{36}O_7$ 4-((E)-3-(3R, 4S, 8aR)- 3-hydroxy-3-isopropyl-6, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yloxy)-3-oxoprop-1-enyl)-1, 2-phenylene diacetate
MM=484,58 g/mol	
même protocole que pour le composé 1b, impliquant le jaeschkenadiol (50 mg, 0,209 mmol), l'acide (E)-3-(3,4-diacetoxyphenyl) acrylique (73,9 mg, 0,293 mmol), le DMAP (8 mg, 0,063 mmol) et le DCC (80 mg, 0,376 mmol). Après purification par flash chromatographie (EP/AcOEt 8 : 2) on obtient le produit attendu sous forme d'un solide amorphe (37 mg, 36%, Rf= 0,29).	
<u>RMN 1H (300MHz, $CDCl_3$):</u> partie DAUCANE + 7,66 (1H,d, 15.9 Hz, H18), 7,44 (1H, dd, J=2,1 Hz et J= 8,4 Hz, H24), 7,40 (1H, d, 2,1 Hz, H23), 7,27 (1H, d, 8,4 Hz, H20), 6,37 (1H, d, 15,9 Hz, H17), 2,35 (3H, s, H26), 2,34 (3H, s, H28).	
<u>RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$):</u> δ 17,5 (C12), 18,5 (C13), 20,1 (C15), 20,6 (C26-C28), 26,5 (C14), 31,9 (C2), 37,0 (C11), 37,3 (C3), 41,3 (C7), 41,4 (C1), 44,0 (C10), 60,0 (C5), 71,1 (C6), 86,3 (C4), 119,5 (C17), 122,7 (C20), 124,0 (C23), 125,2 (C9), 126,6 (C24), 133,2 (C19), 133,5 (C8), 142,5 (C22), 143,5 (C18), 143,6 (C21), 166,6 (C16), 168,0 (C25), 168,1 (C27).	
<u>IR:</u> 3520, 1779, 1697, 1636, 1171 cm^{-1}	
HRMS (DCI- CH_4) M-H $_2O$ calculée pour $C_{28}H_{35}O_6$: 467,2434, trouvée: 467,2456	

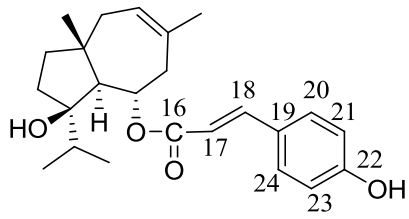
3a 	$C_{24}H_{33}FO_3$ (E)-(3R, 4S, 8aR)- 3-hydroxy-3-isopropyl-6, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yl 3-(4-fluorophenyl) propanoate
MM=388,52 g/mol	
même protocole que pour le composé 1b, impliquant le jaeschkenadiol (50 mg, 0,209 mmol), l'acide 3-(4-fluorophényl) propionique (49 mg, 0,293 mmol), le DMAP (8 mg, 0,063 mmol) et le DCC (80 mg, 0,376 mmol). Après purification par flash chromatographie (EP/AcOEt 9 : 1) on obtient le produit attendu sous forme d'un solide amorphe (59 mg, 73%, Rf= 0,29).	
<u>RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$):</u> partie DAUCANE + δ 7,11 2d (2H, J= 5,4 Hz et J= 5,4 Hz, H20, H24), 6,97 2d (2H, J= 8,7 Hz et J= 8,7 Hz, H21, H23), 2,91 (2H, m, H18), 2,58 (2H, m, H17).	
<u>RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$):</u> δ 17,6 (C12), 18,6 (C13), 20,2 (C15), 26,4 (C14), 30,0 (C18), 36,6 (C17), 31,4 (C2), 37,0 (C11), 40,9 (C3), 41,2 (C7), 41,4 (C1), 44,1 (C10), 60,1 (C5), 71,3 (C6), 87,1 (C4), 115,2 (C23), 115,4 (C21), 125,3 (C9), 129,7 (C24), 129,8 (C20), 133,5 (C8), 136,0 (C19), 161,5 (C22), 172,6 (C16).	
<u>IR:</u> 3524, 1717, 1603, 1451, 1156 cm^{-1}	
HRMS (DCI- CH_4) M-OH calculée pour $C_{24}H_{32}FO_2$: 371,2386, trouvée: 371,2374	

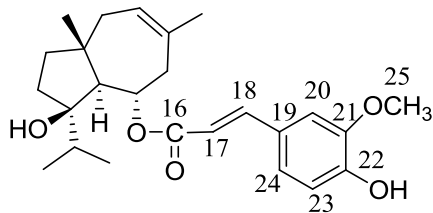
3b	
	$C_{24}H_{34}O_3$ (E)-(3R, 4S, 8aR)- 3-hydroxy-3-isopropyl-6,8a-dimethyl-1, 2, 3,3a, 4, 5,8,8a-octahydroazulen-4-yl-3-phenylpropanoate
MM=370,52 g/mol	
même protocole que pour le composé 1b, impliquant le jaeschkenadiol (50 mg, 0,209 mmol), l'acide 3-phényl propanoïque (44 mg, 0,293 mmol) et 8 mg de DMAP (8 mg, 0,063 mmol) et le DCC (80 mg, 0,376 mmol). Après purification par flash chromatographie (EP/AcOEt 9 : 1) on obtient le produit attendu sous forme d'un solide amorphe (74,4 mg, 96%, Rf= 0,26).	
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): partie DAUCANE + δ 7,19-7,32 (5H, m), 2,95 (2H, t, J= 8,1 Hz, H18), 2,62 (2H, t, J= 7,8 Hz, H17).	
RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 17,5 (C12), 18,5 (C13), 19,9 (C15), 26,5 (C14), 30,9 (C18), 32,0 (C2), 36,6 (C17), 37,2 (C11), 40,9 (C3), 41,2 (C7), 41,3 (C1), 43,9 (C10), 59,8 (C5), 70,8 (C6), 86,2 (C4), 126,4 (C22), 125,0 (C9), 128,3 (C21-C24), 128,6 (C20-C23), 133,5 (C8), 140,4 (C19), 172,8 (C16).	
IR: 3436, 1728, 1497, 1455, 1385, 1150 cm^{-1}	
HRMS (DCI- CH_4) $[M-H]^+$ calculée pour $C_{24}H_{33}O_3$: 369,2430, trouvée: 369,2435	

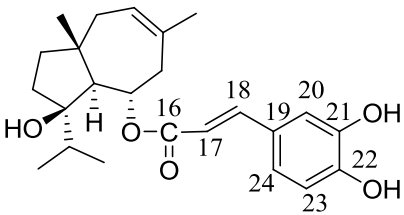
3c	
	$C_{26}H_{36}O_5$ (E)-(3R, 4S, 8aR)-3-hydroxy-3-isopropyl-6, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yl 3-(4-acetoxyphenyl) propanoate
MM=428,56 g/mol	
même protocole que pour le composé 1b, impliquant le jaeschkenadiol (100 mg, 0,420 mmol), l'acide 3-(4-acetoxyphényl) propanoïque (122 mg, 0,586 mmol), le DMAP (15 mg, 0,124 mmol) et le DCC (155 mg, 0,752 mmol). Après purification par flash chromatographie avec l'éluant (EP/AcOEt 9 : 1) on obtient le produit désiré sous forme d'un solide amorphe (128 mg, 72%, Rf= 0,13).	
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): partie DAUCANE + δ 7,23 (2H, d, J= 8,7 Hz, H21, H23), 7,02 (2H, d, J= 8,7 Hz, H20, H24), 2,96 (2H, m, H18), 2,61 (2H, m, H17), 2,30 (3H, s, H26).	
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ 17,4 (C12), 18,4 (C13), 20,0 (C15), 21,1 (C26), 26,5 (C14), 30,2 (C18), 32,2 (C2), 36,5 (C17), 37,2 (C11), 40,9 (C3), 41,2 (C7), 41,3 (C1), 43,9 (C10), 59,8 (C5), 70,8 (C6), 86,2 (C4), 121,6 (C21-C23), 125,0 (C9), 129,3 (C20-C24), 133,5 (C8), 138,0 (C19), 149,1 (C22), 169,6 (C16), 172,6 (C25).	
IR: 3575, 1764, 1722, 1446, 1175 cm^{-1}	
HRMS (ESI) $[MNa]^+$ calculée pour $C_{26}H_{36}O_5Na$: 451,2450, trouvée: 451,2450	

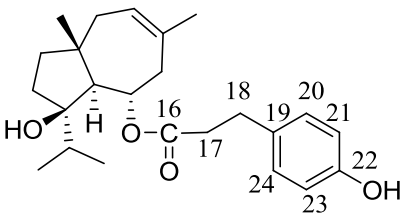
	Férutinine
	$C_{22}H_{30}O_4$ (3R, 4S, 8aR)-3-hydroxy-3-isopropyl-6, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yl 4-hydroxybenzoate
MM=358,21 g/mol	
même protocole que pour le composé 1b. Le composé 1b est dissout dans du dichlorométhane (10 ml). L'ethylenediamine (1,4 ml) est ajoutée puis la solution est laissée sous agitation pendant 3h à température ambiante. La solution est refroidie à 0°C puis lavée avec une solution de H ₂ SO ₄ 3M (2 x 4 ml) et avec une solution saturée de NaCl (3 ml). Les phases organiques sont séchées sur MgSO ₄ puis le solvant est évaporé. Après purification du mélange (161.3 mg) avec flash chromatographie (EP/AcOEt 8 : 2), on obtient la férutinine sous forme d'une poudre blanche cristalline (90,4 mg, rendement 98%, R _f = 0,24).	
RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃): partie DAUCANE + δ 7,94 (2H, d, J= 9 Hz, H18, H22), 6,92 (2H, d, J= 9 Hz, H19, H21).	
RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃): δ 17,6 (C12), 18,6 (C13), 20,2 (C15), 26,4 (C14), 31,4 (C2), 37,0 (C11), 40,9 (C3), 41,2 (C7), 41,4 (C1), 44,1 (C10), 60,1 (C5), 71,3 (C6), 87,1 (C4), 115,5 (C19- C21), 122,0 (C17), 125,3 (C9), 132,1 (C18- C22), 133,5 (C8), 161,1 (C20), 167,4 (C16).	
IR: 3385, 1685, 1609, 1312, 1277 cm ⁻¹	
HRMS (DCI-CH ₄) [MH] ⁺ calculée pour C ₂₂ H ₃₁ O ₄ : 359,2222, trouvée 359,2221	

1d' [54526-95-3]	
	$C_{23}H_{32}O_5$ (3R, 4S, 8aR)-3-hydroxy-3-isopropyl-6, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yl 4-hydroxy-3-methoxybenzoate
MM=370,52 g/mol	
même protocole que pour la férutinine, impliquant le jaeschkenadiol (50 mg, 0,209 mmol), l'acide 3-methoxy-4-(pivaloyloxy) benzoïque (73,9 mg, 0,293 mmol), le DMAP (8 mg, 0,063 mmol) et le DCC (80 mg, 0,376 mmol). Après purification par flash chromatographie (EP/AcOEt 8 : 2) on obtient le produit attendu sous forme d'un solide amorphe (25,6 mg, 60%, R _f = 0,19).	
RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃): partie DAUCANE + δ 7,60 (1H, d, J=8,5 Hz, H22), 7,54 (1H, s, H18), 6,94 (1H, d, J= 8,5 Hz, H21), 3,94 (3H, s, OMe).	
RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃): δ 17,6 (C12), 18,6 (C13), 20,2 (C15), 26,4 (C14), 31,4 (C2), 37,0 (C11), 40,9 (C3), 41,2 (C7), 41,4 (C1), 44,1 (C10), 56,0 (C23), 60,1 (C5), 71,3 (C6), 87,1 (C4), 114,2 (C18), 111,8 (C21), 122,5 (C17), 124,2 (C22), 125,3 (C9), 133,5 (C8), 146,3 (C19), 150,2 (C20), 166,4 (C16).	
IR: 3408, 1690, 1596, 1429, 1284, 1103 cm ⁻¹	
HRMS (DCI-CH ₄) [M-H] ⁺ calculée pour C ₂₃ H ₃₁ O ₅ : 387,2171, trouvée 387,2183	

2c' [126655-14-9]	
	$C_{24}H_{32}O_4$ (E)-(3R, 4S, 8aR)- 3-hydroxy-3-isopropyl-6, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yl 3-(4-hydroxyphenyl) acrylate
MM=384,51 g/mol	
même protocole que pour la férutinine, impliquant le jaeschkenadiol (50 mg, 0,209 mmol), l'acide (E)-3-(4-(pivaloyloxy) phenyl) acrylique (73 mg, 0,293 mmol), le DMAP (8 mg, 0,063 mmol) et le DCC (80 mg, 0,376 mmol). Après purification par flash chromatographie (EP/AcOEt 8 : 2) on obtient le produit attendu sous forme d'un solide amorphe (30 mg, 37%, Rf= 0,16).	
RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): partie DAUCANE + δ 7,67 (1H, d, J= 16 Hz, H18), 7,47 (2H, d, J= 8,5 Hz, H20, H24), 6,88 (2H, d, J= 8,5 Hz, H21, H23), 6,28 (1H, d, J= 16 Hz, H17).	
RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 17,6 (C12), 18,6 (C13), 20,1 (C15), 26,5 (C14), 31,7 (C2), 37,3 (C11), 41,0 (C3), 41,2 (C7), 41,4 (C1), 44,0 (C10), 60,1 (C5), 70,8 (C6), 86,6 (C4), 115,4 (C17), 116,0 (C21-C23), 125,2 (C9), 126,9 (C19), 130,2 (C20-C24), 133,6 (C8), 145,4 (C18), 158,1 (C22), 167,7 (C16).	
IR: 3345, 1682, 1629, 1604, 1445, 1262 cm^{-1}	
HRMS (DCI- CH_4) $[MH]^+$ calculée pour $C_{24}H_{33}O_4$: 385,2379, trouvée 385,2386	

2d' [475390-62-6]	
	$C_{25}H_{34}O_5$ (E)-(3R, 4S, 8aR)- 3-hydroxy-3-isopropyl-6, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yl 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) acrylate
MM=414,53 g/mol	
même protocole que pour la férutinine, impliquant le jaeschkenadiol (50 mg, 0,209 mmol), l'acide (E)-3-(3-methoxy-4-(pivaloyloxy) phenyl) acrilique (81,5 mg, 0,293 mmol), le DMAP (8 mg, 0,063 mmol) et le DCC (80 mg, 0,376 mmol). Après purification par flash chromatographie (EP/AcOEt 8 : 2) on obtient le produit attendu sous forme d'un solide amorphe (38,2 mg, 71%, Rf= 0.17).	
RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): partie DAUCANE + δ 7,65 (1H, d, J= 16 Hz, H18), 7,12 (1H, dd, J= 1,5 Hz et J= 8,5 Hz, H24), 7,06 (1H, d, J= 2Hz, H20), 6,96 (1H, d, J=8,5 Hz, H23), 6,27 (1H, d, J= 16Hz, H17).	
RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 17,6 (C12), 18,6 (C13), 20,1 (C15), 26,5 (C14), 31,7 (C2), 37,3 (C11), 41,0 (C3), 41,3 (C7), 41,5 (C1), 44,0 (C10), 56,0 (C25), 60,1 (C5), 70,7 (C6), 86,3 (C4), 109,5 (C20), 114,7 (C17), 115,5 (C23), 125,2 (C9), 126,8 (C19), 123,2 (C24), 133,6 (C8), 145,6 (C18), 146,8 (C21), 148,1 (C22), 167,5 (C16).	
IR: 3415, 1689, 1629, 1268, 1172 cm^{-1}	
HRMS (DCI- CH_4) $[MH]^+$ calculée pour $C_{25}H_{35}O_5$: 415,2484, trouvée: 415,2476	

2e' [475390-61-5] 	$C_{24}H_{32}O_5$ (E)-(3R, 4S, 8aR)- 3-hydroxy-3-isopropyl-6, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yl)-3-(3, 4-dihydroxyphenyl) acrylate
MM=400,51 g/mol	
même protocole que pour la férutinine, impliquant le jaeschkenadiol (50 mg, 0,209 mmol), l'acide (E)-3-(3,4-diacetoxyphenyl) acrylique (73,9 mg, 0,293 mmol), le DMAP (8 mg, 0,063 mmol) et le DCC (80 mg, 0,376 mmol). Après purification par flash chromatographie (EP/AcOEt 7 : 3) on obtient le produit attendu sous forme d'une huile verte (22,5 mg, 27%, Rf= 0,16).	
RMN 1H (500 MHz, $CDCl_3$): partie DAUCANE + δ 7,74 (1H, d, 15,9 Hz, H17), 7,21 (1H, d, 1,8 Hz, H20), 7,06 (1H, dd, J=1,8 Hz et J= 8,4 Hz, H23), 6,92 (1H, d, 8,1 Hz, H24), 6,57 (1H, d, 15,9 Hz, H17).	
RMN ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$): δ 17,7 (C12), 18,6 (C13), 20,2 (C15), 26,3 (C14), 31,2 (C2), 36,8 (C11), 40,9 (C3), 41,1 (C7), 41,7 (C1), 44,3 (C10), 60,5 (C5), 71,4 (C6), 87,8 (C4), 114,2 (C20), 114,6 (C23), 115,0 (C24), 122,2 (C17), 125,5 (C9), 126,8 (C8), 133,4 (C19), 144,4 (C21), 147,0 (C18), 147,7 (C22), 169,8 (C16).	
IR: 3373, 1682, 1674, 1633, 1601, 1178 cm^{-1}	
HRMS (DCI- CH_4) $[MH]^+$ calculée pour $C_{24}H_{33}O_5$: 401,2328, trouvée: 401,2342	

3c' [475390-58-0] 	$C_{24}H_{34}O_4$ (E)-(3R, 4S, 8aR)- 3-hydroxy-3-isopropyl-6, 8a-dimethyl-1, 2, 3, 3a, 4, 5, 8, 8a-octahydroazulen-4-yl 3-(4-hydroxyphenyl) propanoate
MM=386,52 g/mol	
même protocole que pour la férutinine, impliquant le jaeschkenadiol (100 mg, 0,420 mmol), l'acide 3-(4-acetoxyphenyl) propanoïque (122 mg, 0,586 mmol), le DMAP (15 mg, 0,124 mmol) et le DCC (155 mg, 0,752 mmol). Après purification par flash chromatographie (EP/AcOEt 8 : 2) on obtient le produit attendu sous forme d'un solide amorphe (108 mg, 67%, Rf= 0,24)	
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$): partie DAUCANE + δ 7,10 (2H, d, J= 8,4 Hz, H20, H24), 6,79 (2H, d, J= 8,4 Hz, H21, H23), 2,92 (2H, m, H18), 2,60 (2H, m, H17).	
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$): δ 17,5 (C12), 18,5 (C13), 20,0 (C15), 26,5 (C14), 30,0 (C18), 31,8 (C2), 37,0 (C11), 37,2 (C17), 40,9 (C3), 41,3 (C7), 41,3 (C1), 43,9 (C10), 59,8 (C5), 70,9 (C6), 86,5 (C4), 115,5 (C21-C23), 125,0 (C9), 129,4 (C20-C24), 132,3 (C8), 133,5 (C19), 154,3 (C22), 173,0 (C16).	
IR: 3388, 1712, 1615, 1450, 1150 cm^{-1}	
HRMS (DCI- CH_4) calculée pour $C_{24}H_{34}O_4$: 386,2457, trouvée: 386,2453	

Lignées cellulaires, culture et traitements

Les lignées cellulaires étudiées sont les lignées humaine cancéreuses du sein œstrogéno-dépendante MCF-7 (ATCC, *American Type Culture Collection*, Etats Unis) et œstrogéno-indépendante MDA-MB-231 (ATCC), la lignée normale immortalisée du sein MCF-10A (ATCC) et les cellules aortique endothéliale humaine HAEC (Lonza, Etats Unis). Les lignées cellulaires cancéreuses prostatiques utilisées PC-3, DU 145 et 22Rv1 et les lignées cellulaires ovariennes OVCAR-3, SKOV-3 et IGROV-1 ont été initialement obtenues de l'ATCC.

Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 ont été cultivées dans le milieu RPMI 1640 (Lonza, Suisse). Ce milieu a été complété par les antibiotiques pénicilline/streptomycine (100 U/ml et 100 µg/ml, Sigma, Etats Unis) et par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Sigma, Etats Unis). Pour les études en milieu sans le rouge de phénol, les cellules MCF-7 ont été cultivées dans le milieu DMEM (Lonza, Etats Unis) supplémenté par 10% SVF décomplémenté (traité sur charbon) et par 1% pénicilline/streptomycine. Les cellules MCF-10A sont cultivées dans du milieu Ham's F12: DMEM (50:50), 2,5 mM L-glutamine, 20 ng/ml EGF (*Epidermal Growth Factor*) (Sigma, Etats Unis), 0,1 µg/ml choléra toxine (Sigma, Etats Unis), 10 µg/ml insuline (Sigma, Etats Unis), 500 ng/ml hydrocortisone (Sigma, Etats Unis) et 5% sérum de cheval. Les cellules HAEC ont été cultivées dans du milieu M199, enrichi par 20 % de SVF, de facteur de croissance hypothalamique bovin et d'héparine. Ces cellules sont décollées deux fois par semaine et utilisées dans les expériences jusqu'à le 8^{ème} passage. Les cellules PC-3, DU 145 et 22Rv1 ont été cultivées dans le milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% SVF, 1% pénicilline/streptomycine et 1% acides aminées non essentiels. Les cellules OVCAR-3, SKOV-3 et IGROV-1 ont été cultivées dans le milieu RPMI 1640 supplémenté par 10% SVF et par 50 µM gentamycine. Toutes les cellules sont cultivées en atmosphère humide (95 %) avec 5 % de CO₂ dans un incubateur thermostaté à 37°C.

Pour toutes les études réalisées, les cellules ont étéensemencées à une densité de 13000 cellules/ml pour les cellules MCF-7, MDA-MB-231 et MCF-10A, 10000 cellules/ml pour les cellules HAEC, 10000 cellules/ml pour les cellules PC-3 et D U 145, 18000 cellules/ml pour les cellules 22Rv1, 20000 cellules/ml pour les cellules OVCAR-3, 10000 cellules/ ml pour les cellules SKOV-3 et 17500 cellules/ml IGROV-1 après avoir été décollées du flasque de culture par de la trypsine (TrypsineEDTA, Gibco, Etats Unis). Les numérations des cellules viables ont été réalisées sur cellule d'hémocytomètre par le test d'exclusion au bleu Trypan (Sigma, Etats Unis) (les cellules blanches étant viables). Les cellules prolifèrent jusqu'à

atteindre leur phase exponentielle de croissance (estimée pour les quatre lignées à 72 h de prolifération), phase à partir de laquelle les cellules sont traitées ou non par des molécules contenues dans du milieu de culture.

Les solutions mères de la férutinine et de ses analogues à 30 M ont été préparées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) puis diluées dans le milieu de culture pour obtenir les concentrations finales voulues (0,1 nM à 75 μ M). Les cellules contrôles ont été cultivées dans du milieu de culture. Les cellules véhicule ont été traitées par le même volume du DMSO sans jamais dépasser 0,75 % du DMSO et le milieu est renouvelé (milieu avec ou sans molécules) tous les deux jours.

Test de viabilité cellulaire, bleu de Trypan

Le test d'exclusion cellulaire permet de différencier entre les cellules vivantes et les cellules mortes par leur intégration différentielle du colorant bleu de Trypan. Les cellules mortes perdent leur intégrité membranaire et seront perméables au colorant, ils sont alors observés sous microscope en bleu. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits et cultivées pendant 24 h dans 1 ml de milieu de culture avant d'être traitées. Pour chaque condition analysée, 2 puits différents sont réalisés. Le traitement a été réalisé pendant la phase de croissance et dure de 24 à 72 h, le milieu étant inchangé pendant ces jours. Pour chaque temps étudié, les cellules ont été collectées par l'action de la trypsine et comptées dans un hemocytomètre. Les résultats ont été présentés en nombre de cellules viables/mortes ou en pourcentage du contrôle.

Test colorimétrique de la prolifération cellulaire, MTT

Le test au MTT (Promega, Etats Unis) est utilisé pour évaluer le nombre de cellules viables. Il est basé sur la transformation du MTT en cristaux bleus de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Les cristaux de formazan formés sont solubilisés et sont ainsi détectables par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 550 nm. Ce test a été utilisé pour comparer la croissance des cellules contrôles à celles des cellules traitées par les molécules. Les cellules (MCF-7, MDA-MB-231 et MCF-10A) ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits selon une densité de 10^3 cellules/puits et cultivées pendant 24 h dans 100 μ l de milieu de culture avant d'être traitées. Pour chaque condition

analysée, 3 puits différents sont réalisés (n= 3). Le traitement a été réalisé pendant la phase de croissance et dure de 24 à 72 h, le milieu étant inchangé pendant ces jours. Pour chaque temps étudié, 15 µl de la solution de MTT (Sigma, Etats Unis) (5 mg/ml, en tampon PBS) ont été ajoutés dans chaque puits. Après 3 h d'incubation à 37°C en atmosphère humide, 100 µl d'une solution de lyse (SDS : 10 % ; HCl : 0,01 N) ont été ajoutés par puits et les plaques ont été incubées à 37°C pendant minimum 3 h à l'obscurité afin de libérer les cristaux de formazan formés. L'absorbance a été mesurée à 550 nm, par un lecteur de plaques ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Multiskan EX, Labsystems, Etats Unis). Les blancs de lecture correspondent à du milieu de culture contenant du MTT et la solution de lyse.

Les résultats ont été présentés en pourcentage du contrôle :

$(DO \text{ moyenne des cellules traitées} / DO \text{ moyenne des cellules contrôles}) \times 100 \pm \text{écart-type}$

DO= densité optique

La morphologie des cellules traitées ou non par la férutinine a été observée en microscopie optique à contraste de phase.

Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de Flux

Les cellules ont étéensemencées en plaque 6 puits pendant 24 h, les cellules de 2 puits ont été réunies pour l'analyse et chaque condition est réalisée en duplicata. Les cellules ont été traitées ou non par 30 µM et 60 µM de férutinine (24 h, 48 h et 72 h). Une fois traitées, les cellules flottantes et les cellules adhérentes ont été récupérées, centrifugées et lavées deux fois en PBS 1X. Les cellules récupérées ont été mis dans un nouveau tube, perméabilisées et fixées dans 4 ml d'éthanol à 1000 % (pendant une semaine à -20°C). Après cette étape à -20°C, les cellules ont été récupérées par centrifugation avant d'être lavées deux fois en PBS froid, reprises dans 500 µl de PBS froid. Les cellules ont été ensuite marquées à l'iodure de propidium (50 µg/ml) juste avant analyse.

Les analyses ont été effectuées par cytométrie de flux à l'aide d'un analyseur-trieur FACS DIVA (Becton Dickinson, USA). L'excitation de l'IP a été réalisée avec la raie d'un laser à Argon à 488 nm et l'émission de fluorescence rouge (IP) est recueillie pour des longueurs d'ondes supérieures à 600 nm. Les analyses ont été faites sous forme de cytogramme: pic du signal de fluorescence (FSC, *Forward Scatter*) en fonction de la surface du signal de fluorescence rouge (SSC, *Side Scatter*) afin d'éliminer les événements correspondants aux débris, agrégats et doublets. Un minimum de 10⁴ cellules a été analysé.

Analyse qualitative de l'apoptose

Les cellules sontensemencées sur des lamelles de verre dans des plaques de 12 puits, prolifèrent pendant 24 h avant d'être traitées ou non par 30 μM et 60 μM de férutinine (24 h, 48 h et 72 h). Les cellules flottantes et les cellules adhérentes ont été récupérées. Les cellules flottantes ont été mises sur des lames de centrifugation puis fixées sur des lames histologiques dans du milieu de montage spécifiques. Les cellules adhérentes ont été lavées deux fois avec le PBS 1X, puis marquées avec le DAPI (Hoechst 33342, 10 mg/ml, 1:10000 dilution in PBS 1X) (Molecular Probes, Etats Unis). Les cellules ont été observées sous microscope à fluorescence (Zeiss Z,1, Allemagne) à la recherche des corps apoptotiques.

Western Blot (Immunoblot)

Préparation des lysats cellulaires

Les cellules sontensemencées dans en plaque 6 puits selon une densité bien déterminée auparavant. Après 24 h de prolifération, les cellules sont traitées ou non par les différentes concentrations de férutinine pendant 1 h, 6 h et 48 h. Les cellules adhérentes sont récupérées, centrifugées, lavées en tampon PBS 1X froid. Les culots cellulaires peuvent être congelés à -80°C si nécessaire. Les cellules sont lysées dans du tampon de lyse cellulaire (0,5 M Tris-HCl, PH=6,8 ; 2 % SDS, 20 % glycérol) contenant 40 $\mu\text{l/ml}$ d'une solution d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics, Etats Unis) et 100 $\mu\text{l/ml}$ d'une solution d'inhibiteurs de phosphatase. Les suspensions cellulaires ainsi obtenues sont alors traitées aux ultrasons à raison de 10 cycles (30s on et 30s off) (sonicateur Bioruptor Plus, Etats Unis) afin d'éliminer les débris membranaires et le matériel insoluble.

Dosage des protéines par la méthode de Bradford

La concentration protéique des lysats cellulaires est déterminée par comparaison à une gamme de concentrations comprises entre 0 et 1,5 $\mu\text{g/mL}$ d'albumine sérique bovine en suivant la méthode décrite par Bradford (Bio-Rad, Etats Unis). La qualité des dosages est systématiquement contrôlée par l'utilisation d'un standard protéique de concentration connue.

Electrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE)

La technique d'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) réalisée en conditions dénaturantes, en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS), permet une séparation des protéines selon leur poids moléculaire.

100 µg de protéines sont dénaturées avec 5 % β -mercaptoéthanol et les chauffant 5 min à 100°C après avoir ajouté 5 % bleu de bromophénol. Les échantillons protéiques, de même que des marqueurs de poids moléculaire (Prism Ultra protein ladder, Abcam, Royaume-Uni), sont alors séparés par passage successif dans un gel de concentration et dans un gel de séparation constitués respectivement de 12 % d'acrylamide/bisacrylamide (Bio-Rad, Etats Unis). La migration s'effectue à température ambiante dans du tampon de migration [25 mM Tris ; 192 mM glycine ; 0,1% (m/v) SDS] placé dans un champ électrique de 30 mA.

Immunodétection

Après migration électrophorétique, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinyle difluoride PVDF (Bio-Rad, Etats Unis) par électrotransfert. Le transfert est réalisé en condition immergée dans du tampon de transfert soumis à une tension de 80 V pendant 2 h 30 min. L'efficacité du transfert est alors vérifiée par coloration de la membrane au rouge Ponceau [0,2 % (m/v) Rouge Ponceau S ; 3 % (v/v) acide acétique]. La membrane est ensuite saturée pendant 1 h dans du tampon TBST 1X [20 mM Tris-HCl, pH 7,6 ; 137 mM NaCl ; 0,1 % Tween-20] contenant 5 % (m/v) de lait écrémé. Après trois lavages dans du TBST 1X, la membrane est incubée pendant une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire d'intérêt. Les conditions d'utilisation des différents anticorps primaires utilisés sont présentées dans le Tableau 39 ci-dessous. L'anticorps anti- β -actine est utilisé afin de vérifier l'homogénéité des dépôts protéiques. La membrane est ensuite lavée trois fois 5 min dans du TBST 1X avant d'être marquée pendant 1 h avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort (HRP): anti-IgG de lapin préparé chez la chèvre (Santa Cruz) ou anti-IgG de souris préparé chez le lapin (Santa Cruz, Etats Unis) dilué au 1/4000. Après trois nouveaux lavages dans le TBST 1X, la membrane est mise en présence du substrat de la HRP (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz, Etats Unis) et la chimiluminescence générée est visualisée et quantifiée à l'aide du système Molecular Imager ChemiDoc XRS.

Tableau 39 : Anticorps utilisés dans l'étude.

Anticorps	Poids moléculaire (KDa)	Type d'anticorps	Dilution	Fournisseur
Phospho Ser 118-RE α	66	Monoclonal, lapin	1 :1000	GeneTex, Etats Unis
Phospho Ser-105-RE β	57	Monoclonal, lapin	1 :1000	EnoGene, China
β -actine	42	Monoclonal, lapin	1 :1000	Sigma, Etats Unis

Immunofluorescence: détection des REs

Les cellules sont ensemencées sur lamelle de verre dans des plaques de 12 puits. Au bout de 24 h, les cellules ont adhéré sur les lamelles. Le milieu de culture est alors remplacé par du milieu de culture frais contenant la molécule à tester. A la fin du temps de traitement souhaité, le milieu de culture est éliminé par aspiration. Les cellules sont lavées trois fois pendant 5 min dans du PBS 1X froid avant d'être fixées pendant la nuit à -20°C dans une solution de méthanol. Après trois lavages supplémentaires, les cellules sont bloquées pendant 1 h à température ambiante grâce à une solution contenant 3% d'albumine sérique bovine dans du PBS 1X. Les lamelles sont alors mises en contact avec l'anticorps primaire anti-RE α/β dilué au 1/500 pendant une nuit à 4°C. Les lamelles sont à nouveau lavées trois fois avec du PBS 1X, puis incubées pendant 1 h à température ambiante et à l'obscurité avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'AlexaFluor 488 (1/500, fluorescence rouge, Molecular Probes, Etats Unis). Les cellules sont lavées quatre fois dans du PBS 1X. Lors de l'avant-dernier lavage, l'ADN des cellules est marqué en présence de 50 $\mu\text{g/mL}$ de DAPI, fluorescence bleue (Sigma-Aldrich) pendant 5 min. Finalement, les lamelles sont montées sur lames histologiques dans du milieu de montage (Life technologies, Etats Unis) et les cellules sont visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence confocale (laser scanning confocal microscopy, LSM710, Carl Zeiss, Allemagne).

Test de formation des sphères

La présence des cellules souches/progénitrices dans une population cancéreuse est caractérisée par leur capacité à induire la formation des sphéroïdes en culture non adhérente. Le test de formation des sphères est utilisé pour induire la formation des sphéroïdes à partir des cellules cancéreuses du sein, de la prostate et des ovaires. Les cellules cultivées en 2D ont été détachées, dispersées mécaniquement (avec une seringue) en cellules uniques puis comptées en vue de leur inoculation dans des plaques de 24 puits à raison de 1000 cellules/puits pour les cellules MCF-7, MDA-MB-231, PC-3, DU 145, 22Rv1 et SKOV-3 et à raison de 2000 cellules/puits pour les cellules IGROV-1 et OVCAR-3. Les cellules ont été re-suspendues dans du milieu RPMI contenant 2% SVF et du MatrigelTM (BD, Bioscience, Etats Unis) ratio (1:1) dans un volume total de 50 µl puisensemencées d'une façon circulaire autour des puits. Les cellules ont été laissées 45 minutes dans l'incubateur à 37°C pour que le MatrigelTM se solidifie, puis 500 µl de milieu RPMI-2% SVF est été ajouté (avec ou sans traitement) au milieu des puits. Le milieu de culture a été renouvelé chaque 2 jours jusqu'au jour de la propagation (dépendant de chaque lignée étudiée). Le jour de la propagation, les sphères ont été photographiées et comptées. La propagation des cellules est possible grâce à l'action de la dispase (Invitrogen, Etats Unis) qui permet la dégradation de MatrigelTM, suivie par l'action de la trypsine-EDTA en vue de détacher les cellules. Les cellules ont été comptées puis réintroduites dans les puits pour des générations ultérieures.

Le pouvoir des cellules à former de sphères a été calculé par l'évaluation de l'unité de formation des sphères (UFS) qui est un indicateur de la proportion des cellules souches/progénitrices présente dans la population.

$$\text{UFS} = (\text{nombre de sphères formées} / \text{nombre de cellulesensemencées}) \times 100.$$

Etude des marqueurs cellulaires : « Profiling assay »

Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits à raison de 90×10^3 cellules/puits. Le traitement a été effectué 24 h post-ensemencement par les concentrations croissantes de férutinine (10, 30 et 60 µM). Les cellules ont été récupérées par trypsinisation, centrifugation, lavage avec du PBS puis fixation avec 0,1 % formaldéhyde à trois intervalles de temps (24 h, 48 h, et 72 h). Les cellules ont été stockées à 4°C jusqu'à l'étape du marquage avec les anticorps couplées aux fluorochromes. Lors du marquage, les

cellules ont été centrifugées (5 min à 900 rpm) puis divisées en deux groupes dans des tubes spécifiques pour la cytométrie de flux :

-1/3 des cellules a été pris comme contrôle, non marquées,

-2/3 des cellules ont été marquées.

Le marquage consiste en l'incubation de 1×10^6 cellules avec 2,5 µl de chaque anticorps pendant 15 minutes à la température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules ont été ensuite centrifugées pour éliminée l'excès d'anticorps non fixés puis re-suspendues avec 250 µl de PBS. Les anticorps utilisés sont l'anti-CD24 (Biolegend, Etats Unis) couplé au FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) et l'anti-CD44 (Biolegend, Etats Unis) couplé à l'APC (*Allophycocyanin*).

Un total de 10000 événements a été utilisé par la cytométrie de flux (FSCSAria, Becton Dickinson, Etats Unis) pour représenter la proportion des cellules exprimant les marqueurs CD24 et CD44 a la surface des cellules. L'analyse des résultats a été effectuée en utilisant le logiciel FlowJo.

Recolonisation cellulaire: test de la cicatrice

Ce processus résulte de la combinaison des processus de prolifération et de motilité cellulaire et peut s'évaluer à l'aide du test de la cicatrice. Pour cela, les cellules sont ensemencées 2 à 3 jours avant le début de l'analyse dans des plaques de 6 puits, à une densité suffisamment élevée pour obtenir un tapis cellulaire confluent (5×10^5 cellules/puits). La moitié des cellules ont été traitées par la mitomycine pendant 40 minutes pour prévenir la division cellulaire et l'autre moitié ont été laissées comme contrôle. Une griffe (ou « blessure ») est alors réalisée au travers du tapis cellulaire au moyen d'un « tip » de 200 µl ; le milieu est ensuite aspiré et les cellules rincées 2 à 3 fois au PBS afin d'éliminer tout débris cellulaire. Le milieu de culture est renouvelé et les cellules mises en présence du produit analysé (pour les conditions traitées). La recolonisation de la blessure (qui s'apparente à un processus de cicatrisation, d'où le nom du test) est suivie au cours du temps (après 2, 6, 24, 30, 48 et 72 h) grâce à des images prises sur plusieurs intervalles de temps. Sur la séquence d'images, le pourcentage de surface progressivement recolonisée est alors déterminé grâce au logiciel du microscope Zen (Zeiss, Allemagne).

Test de la migration cellulaire: «Chambre de Boyden»

L'invasivité des cellules tumorales est étudiée en chambre de Boyden modifiée, qui mesure la capacité de migration des cellules à travers les pores d'un filtre de 8 µm composé d'une membrane recouverte du MatrigelTM, le tout placé au dessus d'un puits d'une plaque de 24 puits. Le MatrigelTM est dilué dans du PBS 1X froid pour un ratio de 1:10 puis laissée pendant une nuit à l'air pour son séchage avant le test de l'invasion. Les cellules sontensemencées à $2,5 \times 10^5$ cellules/ml dans la chambre supérieure dans 300 µl de milieu sans SVF (avec ou sans traitement). Cinq cents µl de milieu complet sont placés dans les chambres inférieures. Après 24 h et 48 h d'incubation à 37°C, les cellules non invasives restées dans la chambre supérieure sont retirées à l'aide d'un coton-tige, tandis que les cellules invasives ayant migré dans les chambres inférieures sont colorées avec hématoxyline et éosine. Les cellules ont été ensuite comptées à l'aide d'un microscope optique.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques des résultats sont données pour des expériences réalisées au moins trois fois et de manière indépendante. Les résultats sont présentés comme une moyenne \pm écart-type. Le **test t de Student**, un test d'hypothèse paramétrique, a été utilisé pour comparer les moyennes de deux petits échantillons indépendants. Les résultats sont jugés statistiquement différents lorsque la probabilité critique p est inférieure à 0,05 par comparaison avec le contrôle. Si l'hypothèse nulle H_0 d'égalité entre les moyennes des deux populations est vérifiée, alors la variable aléatoire t définie ci-dessous suit la loi de Student avec $(n_1 + n_2 - 2)$ degrés de liberté.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{x_1 x_2} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Soient \bar{X}_1 et \bar{X}_2 les moyennes des deux populations : n_1 et n_2 les tailles des deux populations ; et $S_{x_1 x_2}$ la moyenne pondérée des variances des deux populations.

L'hypothèse H_0 est testée par comparaison de la valeur calculée de t avec la valeur critique au seuil α (risque de première espèce) donnée par la table de Student avec $(n_1 + n_2 - 2)$ degrés de liberté. Si la valeur absolue de t est supérieure à cette valeur critique, alors H_0 est rejetée. Autrement dit, les moyennes des deux populations sont différentes.

VIII Bibliographie

Agnusdei D, Crepaldi G, Isaia G, Mazzuoli G, Ortolani S, Passeri M, Bufalino L. A double blind, placebo-controlled trial of ipriflavone for prevention of postmenopausal spinal bone loss. *Calcif Tissue Int* 1997;61:142-7.

Al-Ja'fari AH, Vila R, Freixa B, Tomi F, Casanova J, Costa J, Cañigüeral S. Composition and antifungal activity of the essential oil from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*. *Phytochemistry* 2013 ;72 :1406–1413.

Alkhatib R, Hennebelle T, Joha S, Idziorek T, Preudhomme C, Quesnel B, Sahpaz S, Bailleul F. Activity of elaeochytrin A from *Ferula elaechytris* on leukemia cell lines. *Phytochemistry* 2008; 69: 2979-2983.

Allouh MZ. Effect of *Ferula hermonis* root extract on rat skeletal muscle adaptation to exercise. *Experimental Biology and Medicine* 2011;236:1373-1378.

Al-Yahya MA, Muhammad I, Mirza HH, El-Feraly FS. Antibacterial constituents from the rhizomes of *Ferula communis*. *Phytotherapy Research* 1998;12:335-339.

Antal MC, Krust A, Chambon P, Mark M. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2433-38.

Appendino G, Jakupovic J, Alloatti S, Ballero M. Daucane esters from *Ferula Arrigonii*. *Phytochemistry* 1997;45:1639-1643.

Appendino G, Spagliardi P, Cravotto G, Pocock V, Milligan S. Daucane phytoestrogens: A structure activity study. *J Nat Prod* 2002;65:1612-1615.

Appendino G, Spagliardi P, Sterner O, Milligan S. Structure-activity relationships of the estrogenic sesquiterpene ester ferutinin. Modification of the terpenoid core. *J Nat Prod* 2004;67:1557-1564.

Arghiani N, Matin MM, Bahrami AR, Iranshahi M, Sazgarnia A, Rassouli FB. Investigating anticancer properties of the sesquiterpene ferutinin on colon carcinoma cells, in vitro and in vivo. *Life Science* 2014;109:87-94.

Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. Structure-function relationship of estrogen receptor [alpha] and [beta]: Impact on human health. *Mol Aspects Med* 2006;27:299-402.

Auzi AA, Gray AI, Salem MM, Badwan AA, Sarker SD. Feruhermonins A-C: three daucane esters from the seeds of *Ferula hermonis* (Apiaceae). *J Asian Nat Prod Res* 2008; 10:711-717.

Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:537-51.

Bennet NB, Stoltz BM. A unified approach to the daucane and spenolobane bicycle [5.3.0] decane core: enantioselective total synthesis of daucane, daucenal, epoxydaucenal B and 14-para-anisoyloxydauc-4,8-diene. *Chem En J* 2013;19:17745-17750.

Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2496-2500.

Bjornstrom L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 2005;19:833-842.

Blizzard TA, DiNinno F, Morgan JD, II, Chen HY, Wu JY, Kim S, Chan W, Birzin ET, Yang YT, Pai LY, Fitzgerald PMD, Sharma N, Li Y, Zhang Z, Hayes EC, DaSilva CA, Tang W, Rohrer SP, James M, Schaeffer JM, Hammond ML. Estrogen receptor ligands. Part 9: Dihydrobenzoxathiin SERAMs with alkyl substituted pyrrolidine side chains and linkers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005;15:107-113.

Bombardelli E, Cairolì G, Fontana G, Cristoni A, Mercalli E. Process for the preparation of ferutinine from *Ferula* genus plants. US 7,371,886 B2;2008.

Bonkhoff H. and Berges R., The evolving role of estrogens and their receptors in the development and progression of prostate cancer, *European urology* 2009;55: 533-542.
Boullard B. *Plantes médicinales du monde. Croyances et réalités* 2001; p 229.

Bruneton J. *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales*. (Tec & Doc, Lavoisier. 2009).

Brzozowski AM, Pike ACW, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 1997;389:753-758.

Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves Jr WJ. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the national cancer institute* 1974;53:661-674.

Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT-mediated Activation of Estrogen Receptor α A NEW MODEL FOR ANTI-ESTROGEN RESISTANCE. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276:9817-9824.

Cavani F, Ferretti M, Carnevale G, Bertoni L, Zavatti M, Palumbo C. Effects of different doses of ferutinin on bone formation/resorption in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 2012; 30:619-629.

Chang ET, Lee VS, Canchola AJ, Dalvi TB, Clarke CA, Reynolds P, et al. Dietary patterns and risk of ovarian cancer in the California Teachers Study cohort. *Nutr Cancer* 2008;60:285-91.

Chen B, Teranishi R, Kawazoe K, Takaishi Y, Honda G, Itoh M, Takeda Y, Kodzhimatov OK. Sesquiterpenoids from *Ferula kuhistanica*. *Phytochemistry* 2000;54:717-722.

Chiaffarino F, Pelucchi C, Parazzini F, Negri E, Franceschi S, Talamini R, Conti E, Montella M, La Vecchia C. Reproductive and hormonal factors and ovarian cancer. *Ann Oncol* 2001;12: 337-341.

Chodak G, Sharifi R, Kasimis B, Block NL, Macramalla E, Kennealey GT. Single-agent therapy with bicalutamide: A comparison with medical or surgical castration in the treatment of advanced prostate carcinoma. *Urology* 1995;46:849-855.

Chu S, Mamers P, Burger HG, Fuller P.J. Estrogen receptor isoform gene expression in ovarian stromal and epithelial tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 2000; 85:1200–1205.

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 2006;66:9339-44.

Claus EB, Stowe M, Carter D, Holford T. The risk of a contralateral breast cancer among women diagnosed with ductal and lobular breast carcinoma in situ: data from the Connecticut Tumor Registry. *Breast* 2003;12:451-6.

Colditz G, Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status : data from the Nurses Health Study. *Am. J. Epidemiol* 2000;152:950-964.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65:10946-51.

Colman-Saizarbitoria T, Boutros P, Amesty A, Bahsas A, Mathison Y, Garrido MDR, Israel A. Ferutinin stimulates nitric oxide synthase activity in median eminence of the rat. *Journal of Ethnopharmacology* 2006;106:327-332.

Cos P, DeBruyne T, Apers S, Vanden Berghe D, Pieters L, Vlietinck AJ. Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med* 2003;69:589-599.

Coste H, Flahault CH. Flore Description et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes. Tome II (Librairie scientifique et technique, Paris. 1998).

Cox RL, Crawford ED. Estrogens in the treatment of prostate cancer. *The Journal of Urology* 1995;154:1991-1998.

Craft N, Shoa K Carey M, Sawyers C. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nature America Inc* 1999;5:280-285.

Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in molecular medicine* 2013;19:197–209.

Cuzick J. Aromatase Inhibitors for Breast Cancer Prevention. *J Clin Oncol* 2005;23:1636-1643.

D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, Samperi R. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Science of the Total Environment* 2003;302:199-209.

Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 2006;58:773-781.

Dai SY, Chalmers MJ, Bruning J, Bramlett KS, Osborne HE, Montrose-Rafizadeh C, Barr RJ, Wang Y, Wang M, Burris TP, Dodge JA, Griffin PR. Prediction of the tissue-specificity of selective estrogen receptor modulators by using a single biochemical method. *PNAS* 2008;105:7171-7176.

Dall'Acqua S, Linardi MA, Maggi F, Nicoletti M, Petitto V, Innocenti G, Basso G, Viola G. Natural daucane sesquiterpenes with antiproliferative and proapoptotic activity against human tumor cells. *Bioorganic and medicinal chemistry* 2011;19:5876-5885.

Dell'Aghi M, Galli GV, Dal Cero E, Belluti F, Matera R, Zironi E, Pagliuca G, Bosisio E. Potent inhibition of phosphodiesterase-5 by Icariin derivatives. *J Nat Prod* 2008;71:1513-1517.

Denis L. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) prostate cancer trials, 1976-1996. *Urology* 1998;51:50-57.

Deroo BJ and Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *The Journal of Clinical Investigation* 2006; 116:561-570.

Diab Y, Dolmazon R, Bessiere JM. Daucane aryl esters composition from the Lebanese *Ferula hermonis* boiss (zallooh root). *Flavour and Fragrance Journal* 2001b;16:120-122.

Diab Y, Dolmazon R, Fenet B. 2,3- α -Epoxyjaeschkenadiol 5-benzoate from *ferula hermonis* boiss. *Flavour and Fragrance Journal* 2001a;16:397-400.

Diel O, Olff S, Schmidt S, Michna H. Molecular identification of potential selective estrogen receptor modulator (SERM) like properties of phytoestrogens in the human breast cancer cell line MCF-7. *Planta Med* 2001;67:510-4.

Dykstra KD, Guo L, Birzin ET, Chan W, Yang YT, Hayes EC, DaSilva CA, Pai LY, Mosley RT, Kraker B, Fitzgerald PMD, DiNinno F, Rohrer SP, Schaeffer JM, Hammond ML. Estrogen receptor ligands. Part 16: 2-Aryl indoles as highly subtype selective ligands for ER α . *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007;17:2322-2328.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomized trials. *The Lancet* 2005;365:1687-1717.

Edefonti V, Randi G, Decarli A, La Vecchia C, Bosetti C, Franceschi S, et al. Clustering dietary habits and the risk of breast and ovarian cancers. *Ann Oncol* 2009;20:581-90.

Eiler S, Gangloff M, Duclaud S, Moras D, Ruff M. Overexpression, Purification, and Crystal Structure of Native ER α LBD. *Protein Expression and Purification* 2001;22:165-173.

El-Etre AY. Inhibition of C-steel corrosion in acidic solution using the aqueous extract of zallouh root. *Materials Chemistry and Physics* 2008;108:278-282.

Fabian CJ, Kimler BF. Selective estrogen-receptor modulators for primary prevention of breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:1644-1655.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspace family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 2005;37:719-727.

Fang J, Akwabi-Ameyaw A, Britton JE, Katamreddy SR, Navas III F, Miller AB, Williams SP, Gray DW, Orband-Miller LA, Shearin J, Heyer D. Synthesis of 3-alkyl naphthalenes as novel estrogen receptor ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2008;18 :5075–5077.

Fathalla MF. Incessant ovulation-a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971, 2:163.
Feldman A. *Liebigs Ann. Chem* 1865;135:236.

Ferretti M, Bertoni L, Cavani F, Benincasa M, Sena P, Carnevale G, Zavatti M, Di Viesti V, Zanolli P, Palumbo C. Structural and histomorphometric evaluations of ferutinin effects on the uterus of ovariectomized rats during osteoporosis treatment. *Life Science* 2012;16:90(3-4):161-8.

Ferretti M, Bertoni L, Cavani F, Zavatti M, Resca E, Carnevale G, Benelli A, Zanolli P, Palumbo C. Influence of ferutinin on bone metabolism in ovariectomized rats. II: Role in recovering osteoporosis. *J Anat* 2010; 217:48–56.
Fillimore C and Kupewasser C. Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? *Breast cancer research* 2007;9:303.

Foley DA, Leary PO, Buckley NR, Laurence SE, Meguire AR. Synthetic approaches to the daucane sesquiterpene derivatives employing the intramolecular Buchner cyclisation of α -diazoketones. *Tetrahedron* 2013;69:1778-1794.

Foley DA, Maguire AR. Synthetic approaches to bicycle [5.3.0] decane sesquiterpene. *Tetrahedron* 2010;66:1131-1175.

Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-1186.

Forster C, Kietz S, Hultenby K, Warner M, Gustafsson JA. Characterization of the ER β -/- mouse heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:14234-39.

Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nature Reviews Cancer* 2003;3:362-374.

Fuqua SAW, Schiff R, Parra I, Friedrichs WE, Su JL, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Willson TM, Moore JT. Expression of Wild-Type Estrogen Receptor β and Variant Isoforms in Human Breast Cancer. *Cancer research* 1999;59: 5425–5428.

Galal AM, Abourashed EA, Ross S, ElSohly MA, Al-Said MS, El-Feraly FS. Daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis*. *J Nat Prod* 2001;64:399-400.

Gangloff M, Ruff M, Eiler S, Duclaud S, Wurtz JM, Moras D. Crystal Structure of a Mutant hER α Ligand-binding Domain Reveals Key Structural Features for the Mechanism of Partial Agonism. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276:15059-15065.

Gao M, Wong SY, Lau PM, Kong SK Ferutinin Induces in Vitro Eryptosis/Erythroptosis in Human Erythrocytes through Membrane Permeabilization and Calcium Influx. *Chemical Research in Toxicology* 2013;26:1218-1228.

Garrett RH, Grisham CM. *Biochimie* 2000. Paris, De Boeck Université, p.1254.

Geroushi A, Auzi AA, Elhwuegi AS, Elzawam F, Elsherif A, Nahar L, Sarker SD. Antiinflammatory sesquiterpenes from the root oil of *Ferula hermonis*. *Phytother Res* 2011;25:774-777.

Ghisalberti EL. The daucane (carotene) class of sesquiterpenes. *Phytochemistry* 1994;37:597-623.

Glud E, Kjayer SK, Thomsen BL, Hogdall C, Christensen L, Hogdal E, Bock JE, Blaakaer J. Hormone therapy and the impact of estrogen intake on the risk of ovarian cancer. *Arch Intern Med* 2004; 164:2253-2259.

Gougelet A, Bouclier C, Marsaud V, Maillard S, Mueller SO, Korach KS, Renoir JM. Estrogen receptor alpha and beta subtype expression and transactivation capacity are differentially affected by receptor-, hsp90- and immunophilin-ligands in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94:71-81.

Greene GL, Nolan C, Engler JP, Jensen EV. Monoclonal antibodies to human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;77:5115-5119.

Hamilton-Burke W, Coleman L, M, Green CA, Holliday DL, Horgan K, Maraqa L, Peter MB, Pollock S, Shaaban AM, Smith L, Speirs V. Phosphorylation of Estrogen Receptor β at Serine 105 Is Associated with Good Prognosis in Breast Cancer. *The American Journal of Pathology* 2010;177:1079-1086.

Harkonen PL, and Makela SI. Role of estrogens in development of prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol* 2004;92:297–305.

Harvey HA, Lipton A, Max DT, Pearlman HG, Diaz-Perches R, de la Garza J. Medical castration produced by the GnRH analogue leuprolide to treat metastatic breast cancer. *Journal of clinical Oncology* 1985;3:1068-1072.

Hatch KD, Beecham, JB, Blessing JA, Creasman WT. Responsiveness of patients with advanced ovarian carcinoma to tamoxifen. A Gynecologic Oncology Group study of second-line therapy in 105 patients. *Cancer* 1991; 68:269–271.

Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, Skipper JK, Dotte A, Thomas P. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10751-10756.

Heldelin M, Lof M, Anderson TM-L, Adlercreutz, Weiderpass E. Dietary phytoestrogens and the risk of ovarian cancer in the women's lifestyle and health cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 2011;20:308-317.

Heldring N, Pawson T, McDonnell D, Treuter E, Gustafsson JA, Pike ACW. Structural Insights into Corepressor Recognition by Antagonist-bound Estrogen Receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 2007;282:10449–10455.

Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal Carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000;21:427-433.

Henke BR, Consler TG, Go N, Hale RL, Hohman DR, Jones SA, Lu AT, Moore LB, Moore JT, Orband-Miller LA, Robinett RG, Shearin J, Spearing PK, Stewart EL, Turnbull PS, Weaver SL, Williams SP, Wisely GB, Lambert MH. A New Series of Estrogen Receptor Modulators That Display Selectivity for Estrogen Receptor β . *J. Med. Chem* 2002;45:5492-5505.

Herynk MH, Fuqua SA. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev* 2004;25:869-898.

Hilan C, Sfeir R, El Hage R, Jawich D, Frem ME, Jawhar K. Evaluation of the antibacterial activities of *Ferula hermonis* (Boiss). *Lebanese Science Journal* 2007;8 :135-151.

Hiscox S, Baruah B, Smith C, Bellerby R, Goddard L, Jordan N, Poghosyan Z, Nicholson RI, Barrett-Lee P, Gee J. Overexpression of CD44 accompanies acquired tamoxifen resistance in MCF7 cells and augments their sensitivity to the stromal factors, heregulin and hyaluronan. *BMC Cancer* 2012;12:458.

Ho S.M. Estrogen and anti-estrogens: key mediators of prostate carcinogenesis and new therapeutic candidates. *Journal of cellular biochemistry* 2004; 91:491-503.

Holub M, Samek Z, Herout V, Sorm F. The constitution of Laserpitine-A sesquiterpenic compound from *Laserpitium latifolium*. *Coll. Czech. Chem. Comm* 1967;32:591.

Howell A, Robertson JFR, Quaresma Albano J, Aschermannova A, Mauriac L, Kleeberg UR, Vergote I, Erikstein B, Webster A, Morris C. Fulvestrant, Formerly ICI 182,780, Is as Effective as Anastrozole in Postmenopausal Women With Advanced Breast Cancer Progressing After Prior Endocrine Treatment. *American Society of Clinical Oncology* 2002;20:3396-3403.

Hsieh RW, Rajan SS, Sharma SK, Guo Y, DeSombre ER, Mrksich M, Greene GL. Identification of Ligands with Bicyclic Scaffolds Provides Insights into Mechanisms of Estrogen Receptor Subtype Selectivity. *The Journal of Biological Chemistry* 2006;281:17909-17919.

Hummel CW, Geiser AG, Bryant HU, Cohen IR, Dally RD, Fong KC, Frank SA, Hinklin R, Jones SA, Lewis G, McCann DJ, Rudmann DG, Shepherd TA, Tian H, Wallace OB, Wang M, Wang Y, Dodge JA. A Selective Estrogen Receptor Modulator Designed for the Treatment of Uterine Leiomyoma with Unique Tissue Specificity for Uterus and Ovaries in Rats. *J. Med. Chem* 2005;48:6772-6775.

Huang SY, Zou X. Ensemble docking of multiple protein structures: considering protein structural variations in molecular docking. *Proteins: Structure, Fonction and Bioinformatics* 2007;66:399-421.

Ibraheim ZZ, Abdel-Mageed WM, Jaspars M. Triterpenoid saponins from *ferula hermonis* Boiss. *biochemical systematics and ecology* 2012;40:86-90.

Ibraheim ZZ, Abed-Mageed WM, Dai H, Guo H, Zhang L, Jaspars M. Antimicrobial antioxidant daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis* Boiss. *Phytother Res* 2012;26:579-586.

Ikeda K, Arao Y, Otsuka H, Nomoto S, Horiguchi H, Kato S, Kayama F. Terpenoids found in the Umbelliferae family act as agonists/antagonists for ER α and ER β : differential transcription activity between ferutinin-liganded ER α and ER β . *Biochemical and Biophysical Research communication* 2002;291:354-360.

Jager W, Sauerbrei W, Beck E, Maassen V, Stumpfe M, Meier W, Kuhn W, Janicke F. 1995. A randomized comparison of triptorelin and tamoxifen as treatment of progressive ovarian cancer. *Anticancer Res.* 15:2639–2642.

Johnson JL, Toft DO. A novel chaperone complex for steroid receptors involving heat shock proteins, immunophilins, and p23. *J Biol Chem* 1994;269:24989-93.

Kai K, Arima Y, Kamiya T, Saya H. Breast cancer stem cells. *Breast cancer* 2010;17:80-85.
Kassem SS, Hanafi EM, Abd El Raouf A, Abdel-Kader MM, Awad GA. Evaluation of *Ferula hermonis* for treatment of Staphylococcal infection. *Journal of Applied Sciences Research* 2012;8:3985-3991.

Kim S, Wu JY, Birzin ET, Frisch K, Chan W, Pai LY, Yang YT, Mosley RT, Fitzgerald PMD, Sharma N, Dahllund J, Thorsell AG, DiNinno F, Rohrer SP, Schaeffer JM, Hammond ML. Estrogen Receptor Ligands. II. Discovery of Benzoxathiins as Potent, Selective Estrogen Receptor α Modulators. *Journal of Medicinal Chemistry* 2004;47:2171-2175.

Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel GU. An estrogen-responsive element derived from the 5'flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell* 1986;46: 1053-1061.

Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 2001;29: 2905-2919.

Koehler KF, Helguero LA, Haldosen LA, Warner M, Gustafsson JA. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr Rev* 2005;26:465-478.

Koide A, Abbatiello S, Rothgery L, Koide S. Probing protein conformational changes in living cells by using designer binding proteins: Application to the estrogen receptor. *PNAS* 2002;99:1253-1258.

Kong EH, Eric H., Heldring N, Gustafsson JA, Treuter E, Hubbard RE, Pike ACW. Delineation of a unique protein–protein interaction site on the surface of the estrogen receptor. *PNAS* 2005;102:3593-3598.

Krop I, Demuth T, Guthrie T, Wen PY, Mason WP, Chinnaiyan P, Butowski N, Groves MD, Kesari S, Freedman SJ, Blackman S, Watters J, Loboda A, Podtelezhnikov A, Lunceford J, Chen C, Giannotti M, Hing J, Beckman R, LoRusso P. Phase I Pharmacologic and

Pharmacodynamic Study of the Gamma Secretase (Notch) Inhibitor MK-0752 in Adult Patients With Advanced Solid Tumors. *Journal of clinical oncology* 2012;30:2307-13.

Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J* 1986;5:891-897.

Kuete V, Wiench B, Hegazy MEF, Mohamed TA, Fankam AG, Shahat AA, Efferth T. Antibacterial activity and cytotoxicity of selected Egyptian medicinal plants. *Planta Med* 2012;78:193-199.

Kuiper G, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson, J. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5925-5930.

Kushner P, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Andrew K, Shiao, Uht RM, Webb P. Estrogen receptor pathways to AP-1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;74: 311-317.

Kuukasjärvi T, Kononen J, Helin H, Holli K, Isola J. Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. *J Clin Oncology* 1996;14:2584–2589.

Lam HM, Suresh Babu CV, Wang J, Yuan Y, Lam YW, Ho SM, Leung YK. Phosphorylation of human estrogen receptor-beta at serine 105 inhibits breast cancer cell migration and invasion. *Mol Cell Endocrinol* 2012;358:27-35.

Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F. ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology* 2001;142:4120-4130.

Leduc AM, Trent JO, Wittliff JL, Bramlett KS, Briggs SL, Chirgadze NY, Wang Y, Burris TP, Spatola AF. Helix-stabilized cyclic peptides as selective inhibitors of steroid receptor-coactivator interactions. *PNAS* 2003;100:11273-11278.

Levisalles J, Rudler CM. [Stereochemistry. XXXIV. Fluorinated steroids. V. Derivatives of dimethyl-4,4 estrane]. *Bull Soc Chim Fr* 1970;664-70.

Lhuiler A, Fabre N, Cheble E, Oueida F, Maurel S, Valentin A, Fouraste I, Moulis C. Daucane sesquiterpenes from *ferula hermonis*. *J Nat Prod* 2005;68:468-471.

Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne K, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC. Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy. *JNCI* 2008;9:672-679.

Liu RH. Potential synergy of phytochemical in cancer prevention: mechanism of action. *International research conference on food, nutrition and cancer* 2004;134:3479S-3485S.

Liu SJ, Liao ZX, Liu C, Ji LJ, Sun HF. Two new sesquiterpenes from *Artemisia sieversiana*. *Fitoterapia* 2014;97:43-9.

- Liu X, Chen C, He W, Huang P, Liu M, Wang Q, Guo H, Bolla K, Lu Y, Song F, Dai H, Liu M, Zhang L. Exploring anti-TB leads from natural products library originated from marine microbes and medicinal plants. *Antonie van Leeuwenhoek* 2012 ;102:447-461.
- Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:675-99.
- Lu RQ, Serrero G. Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. *J Cell Physiol* 1999;179:297-304.
- Ma CH, Dong KW, Yu KL. cDNA cloning and expression of a novel estrogen receptor beta-subtype in goldfish (*Carassius auratus*). *Biochim Biophys Acta* 2000;1490:145-152.
- Macho A, Blanco-Molina M, Spagliardi, P, Appendino G, Bremner, P, Heinrich M, Fiebich BL, Munoz E. Calcium ionophoretic and apoptotic effects of ferutinin in the human Jurkat T-cell line. *Biochem. Pharmacol* 2004; 68:875-883.
- Magee JA, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer stem cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell* 2012;21:283-296.
- Malamas MS, Manas ES, McDevitt RE, Gunawan I, Xu ZB, Collini MD, Miller CP, Dinh T, Henderson RA, Keith Jr. JC, A. Harris HA. Design and Synthesis of Aryl Diphenolic Azoles as Potent and Selective Estrogen Receptor-, Ligands. *J. Med. Chem* 2004; 47:5021-5040.
- Maloney A, Workman P. HSP90 as a new therapeutic target for cancer therapy: the story unfolds. *Expert Opin Biol Ther* 2002;2:3-24.
- Manas ES, Xu ZB, Unwalla RJ, Somers WS. Understanding the Selectivity of Genistein for Human Estrogen Receptor Using X-Ray Crystallography and Computational Methods. *Structure* 2004;12: 2197-2207.
- Masiello D, Cheng S, Bubley GJ, Lu ML, Balk SP. Bicalutamide Functions as an Androgen Receptor Antagonist by Assembly of a Transcriptionally Inactive Receptor. *The journal of Biological Chemistry* 2002;277:26321–26326.
- Matin MM, Nakhaeizadeh H, Bahrami AR, Iranshahi M, Arghiani N, Rassouli FB. Ferutinin, an apoptosis inducing terpenoid from *Ferula ovina*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2014 ;15:2123-2128.
- Maurya R, Dhar KL, Handa SS. A sesquiterpene glucoside from *Tinospora Cordifolia*. *Phytochemistry* 1997;44:749-750.
- McDevitt RE, Malamas MS, Manas ES, Unwalla RJ, Xu ZB, Miller CP, Harris HA. Estrogen receptor ligands: design and synthesis of new 2-arylindene-1-ones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005;15:3137–3142.
- McPherson SJ, Ellem SJ, Simpson ER, Patchev V, Fritzemeier KH, Risbridger GP. Essential role for estrogen receptor beta in stromal-epithelial regulation of prostatic hyperplasia. *Endocrinology* 2007;148:566-574.

- Medina P, Favre G, Poirot M. Multiple Targeting by the Antitumor Drug Tamoxifen: A Structure-Activity Study. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents* 2004;4:491-508.
- Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah O, Pakdel F. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol Reprod* 2002;66:1881-1892.
- Mesmoudi M, Daoud I, Ghalem S. Molecular docking studies on the interactions of human farnesyl pyrophosphate synthase with α -Aminobiphosphonates compounds. *International Journal of Chemical and Analytical Science* 2010;3:1560-1564.
- Mewshaw RE, Bowen SM, Harris HA, Xu ZB, Manas ES, Cohn ST. ER β ligands. Part 5: Synthesis and structure-activity relationships of a series of 40-hydroxyphenyl-aryl-carbaldehyde oxime derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007;17:902-906.
- Mocklinghoff S, van Otterlo WAL, Rose R, Fuchs S, Zimmermann TJ, Seoane MD, Waldmann H, Ottmann C, Brunsveld L. Design and Evaluation of Fragment-Like Estrogen Receptor Tetrahydroisoquinoline Ligands from a Scaffold-Detection Approach. *J. Med. Chem* 2011;54:2005-2011.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996;392:49-53.
- Nadelson J, Simpson WRJ, Anderson RC, Bajwa JS. Benzoic acid derivatives as antidiabetic agents. *US005378728A*;2008.
- Naegeli P, Kaiser R. A new synthetic approach to the acorane-, oaucane- and ceorane skeleton. *Tetrahedron Lett* 1972;20:1013-2016.
- Nazrullaev SS, Saidkhodzhaev AI, Akhmedkhodzhaeva KhS, Syrov VN, Rasulev BF, Khushbaktova ZA. Estrogen activity of terpenoids from plants of the genus *Ferula*. *Chemistry of Natural Compounds* 2008;44:572-577.
- Ndossi DG, Frizzell C, Tremoen NH, Fæste CK, Verhaegen S, Dahl E, Eriksen GS, Sorlie M, Connolly L, Ropstad E. An in vitro investigation of endocrine disrupting effects of trichothecenes deoxynivalenol (DON), T-2 and HT-2 toxins. *Toxicology letters* 2012;214:268-278.
- Nettles KW, Bruning JB, Gil G, O'Neill EE, Nowak J, Hughs A, Kim Y, DeSombre ER, Dilis R, Hanson RN, Joachimiak A, Greene GL. Structural plasticity in the oestrogen receptor ligand-binding domain. *European Molecular Biology Organization* 2007;8:563-568.
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001;81:1535-1565.
- Norman BH, Dodge JA, Richardson TI, Borromeo PS, Lugar CW, Jones SA, Chen K, Wang Y, Durst GL, Barr RJ, Montrose-Rafizadeh C, Osborne HE, Amos RM, Guo S, Boodhoo A,

Krishnan V. Benzopyrans Are Selective Estrogen Receptor, Agonists with Novel Activity in Models of Benign Prostatic Hyperplasia. *J. Med. Chem* 2006;49:6155-6157.

Norman BH, Richardson TI, Dodge JA, Pfeifer LA, Durst GL, Wang Y, Durbin JD, Krishnan V, Dinn SR, Liu S, Reilly JE, Ryter K. Benzopyrans as selective estrogen receptor agonists (SERBAs). Part 4: Functionalization of the benzopyran A-ring. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007;17:5082–5085.

Ososki AL, Kennelly EJ. Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res* 2003;17:845-869.

Oughlissi-Dehak K, Lawton P, Michalet S, Bayet C, Darbour N, Hadj-Mahammed M, Badjah-Hadj-Ahmed YA, Dijoux-Franca MG, Guilet D. Sesquiterpenes from aerial parts of *Ferula vesceritensis*. *Phytochemistry* 2008;69:1933-1938.

Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder B, Bartsch H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of cancer* 2000;36:1235-1247.

Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Warri A, Weihua Z, Van Noorden S, Wahlstrom T, Coombes R C, Warner M, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2002;9:1–13.

Palumbo C, Ferretti M, Bertoni L, Cavani F, Resca E, Casolari B, Carnevale G, Zavatti M, Montanari C, Benelli A, Zanolli P. Influence of ferutinin on bone metabolism in ovariectomized rats. I: role in preventing osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 2009 ;27:538–545.

Park SJ, Kufareva I, Abagyan R. Improved docking, screening and selectivity prediction for small molecule nuclear receptor modulators using conformational ensembles. *J Comput Aided Mol Des* 2010;24:459–471.

Pharmacorama. Médicaments et messagers. In Pharmacorama. Connaissance des médicaments 2008, [En ligne]. <http://www.pharmacorama.com/Rubriques/Messagers.php> (Page consultée en 2014).

Phillips C, Roberts LR, Schade M, Bazin R, Bent A, Davies NL, Moore R, Pannifer AD, Pickford AR, Prior SH, Read CM, Scott A, Brown DG, Xu B, Irving SL. Design and Structure of Stapled Peptides Binding to Estrogen Receptors. *Journal of the American Chemical Society* 2011;133:9696-9699.

Pike ACW, Brzozowski AM, Hubbard RE, Bonn T, Thorsell AG, Engstrom O, Ljunggren J, Gustafsson JA, Carlquist M. Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *The EMBO Journal* 1999;18:4608-4618.

Pimenov MG. and Leonov MV. The genera of the Umbelliferae: a nomenclator. (Royal Botanical Garden, Kew. 1993).

- Poli F, Appendino G, Sacchetti G, Ballero M, Maggiano N, Ranelletti FO. Antiproliferative effects of daucane esters from *Ferula communis* and *F. arrigonii* on human colon cancer cell lines. *Phytother Res* 2005; 19:152-157.
- Renaud J, Bischoff SF, Buhl T, Floersheim P, Fournier B, Geiser M, Halleux C, Keller H, Ramage P. Selective Estrogen Receptor Modulators with Conformationally Restricted Side Chains. Synthesis and Structure-Activity Relationship of ER α -Selective Tetrahydroisoquinoline Ligands. *J. Med. Chem* 2005;48:364-379.
- Renaud J, Bischoff SF, Buhl T, Floersheim P, Fournier B, Halleux C, Kallen J, Keller H, Schlaeppli JM, Stark W. Estrogen Receptor Modulators: Identification and Structure-Activity Relationships of Potent ER α -Selective Tetrahydroisoquinoline Ligands. *J. Med. Chem* 2003;46:2945-2957.
- Reyhaan A, Chaudhri R. Membrane estrogen signaling enhances tumorigenesis and metastatic potential of breast cancer cells via estrogen receptor α (ER α 36). *J Biol Chem* 2012;287:7169-7181.
- Richardson TI, Dodge JA, Durst GL, Pfeifer LA, Shah J, Wang Y, Durbin JD, Krishnan V, Norman BH. Benzopyrans as selective estrogen receptor β agonists (SERBAs). Part 3: Synthesis of cyclopentanone and cyclohexanone intermediates for C-ring modification. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007;17:4824-4828.
- Rodriguez LG, Wu X, Guan JL. Wound-Healing Assay. Cell Migration methods in molecular biology 2005;294:23-29.
- Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, Pearl LH. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *J Med Chem* 1999;42:260-66.
- Russo J, Balogh GA, Heulings R, Mailo DA, Moral R, Russo PA, Sherif F, Vanegas J, Russo IH. Molecular basis of pregnancy-induced breast cancer protection. *Eur J Cancer Prev* 2006;15:306-42.
- Rutherford T, Brown WD, Sapi E, Aschkenazi S, Munoz A, Mor G. Absence of Estrogen Receptor- β Expression in Metastatic Ovarian Cancer. *Obstetrics & Gynecology* 2000;96:417-421.
- Said O, Khalil K, Fulder S, Azaizeh H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and West Bank region. *J Ethnopharmacol* 2002;83:251-265.
- Salah SM, Jager AK. Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. *Journal of Ethnopharmacology* 2005;97:145-149.
- Sargent JM, Taylor CG. Appraisal of the MTT assay as a rapid test of chemosensitivity in acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer* 1989;60:206-210.
- Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, Gustafsson JA, Safe S. Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (α / β) dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem* 2000;275: 5379-5387.

- Segnitz B, Gehring U. Subunit structure of the nonactivated human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2179-83.
- Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor regulated transcription. *Cell* 2000;103: 843-852.
- Shapiro C, Recht A. Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. *Drug Therapy* 2001;344:1997-2008.
- Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL. The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen. *Cell* 1998;95:927-937.
- Singh S, Singh UP, Grizzle WE, Lillard JW. CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. *Laboratory Investigation* 2004;84:1666-1676.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 1973;51:1409-1416.
- Sousa SF, Ribeiro AJM, Coimbra JTS, Neves RPP, Martins SA, Moorthy NSHN, Fernandes PA, Ramos MJ. Protein-ligand docking in the new millennium-A retrospective of 10 yeqrs in the field. *Current Medicinal Chemistry* 2013;20:2296-2314.
- Spare NS, Gupta S, Spare N. Assessing ligand efficiencies using template-based molecular docking and Tabu-clustering on tetrahydroimidazo-[4,5,1-jk][1,4]-benzodiazepin-2-(1H)-one and -thione (TIBO) derivatives as HIV-1RT inhibitors. *J.Chem.Sci* 2008;120:395-404.
- Suboh SM, Bilot YY, Aburjai TA. Protective effects of selected medicinal plants against protein degradation, lipid peroxidation and deformability loss of oxidatively stressed human erythrocytes. *Phytotherapy Research* 2004;18:280-284.
- Tamemoto K, Takaishi Y, Chen B, Kawazoe K, Shibata H, Higuti T, Honda G, Ito M, Takeda Y, Kodzhimatov OK, Ashurmetov O. Sesquiterpenoids from the fruits of *Ferula kuhistanica* and antibacterial activity of the constituents of *F. kuhistanica*. *Phytochemistry* 2001;58:763-767.
- Tan Q, Blizzard TA, Morgan II JD, Birzin ET, Chan W, Yang YT, Pai LY, Hayes EC, DaSilva CA, Warriar S, Yudkovitz J, Wilkinson HA, Sharma N, Fitzgerald PMD, Li S, Colwell L, Fisher JE, Adamski S, Reszka AA, Kimmel D, DiNinno F, Rohrer SP, Freedman LP, Schaeffer JM, Hammond ML. Estrogen receptor ligands. Part 10: Chromanes: old scaffolds for new SERAMs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005;15:1675-1681.
- Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, Kim SJ, Tanji Y, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S. Association of Breast Cancer Stem Cells Identified by Aldehyde Dehydrogenase 1 Expression with Resistance to Sequential Paclitaxel and Epirubicin-Based Chemotherapy for Breast Cancers. *Clin Cancer Res* 2009;15:4324-4241.

Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:5998-6003.

Tortora GJ et Grabowski SR. Principe d'anatomie et de physiologie. Bruxelles : De Bock Université. 2001.

Traboulsi AF, El-Haj S, Tueni M, Taoubi K, Abi Nader N, Mrad A. Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag Sci* 2005 ;61:597–604.

Tung KH, Goodman MT, Wu AH, Wilkens LR, Kolonel LN, Nomura AMY, terada KY, Carney ME, Sobin LH. Reproductive factors and epithelial ovarian cancer risk by histologic type: a multiethnic case-control study. *Am J Epidemiol* 2003;158: 629-638.

Vajdos FF, Hoth LR, Gerghegan KF, Simons SP, Lemotte PK, Danley DE, Ammirati MJ, Pandit J. The 2.0 Å crystal structure of the ERα ligand-binding domain complexed with lasofoxifene. *Protein Science* 2007;16:897–905.

Van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *The prostate* 2003;57:205-225.

Velasco-Velazquez MA, Homsí N, De La Fuente M, Pestell RG. Breast cancer stem cells. *The international journal of biochemistry and cell biology* 2012 ;44:573-577.

Vellonen KS, Honkakoski P, Urtti A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004;23:181–188.

Visvader JE and Lindeman GJ. Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* 2012;10:717-728.

Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM., Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, *et al.* Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:7889-7893.

Wang RA, Mazumdar A, Vadlamudi RK, Kumar R. P21-activated kinase-1 phosphorylates and transactivates estrogen receptor-α and promotes hyperplasia in mammary epithelium. *EMBO J* 2002;21:5437-5447.

Wang S, Yu H, Wickliffe JK. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. *Toxicol Vitro* 2011;25:2147-2151.

Wang Y, Chirgadze NY, Briggs SL, Khan S, Jensen EV, Burris TP. A second binding site for hydroxytamoxifen within the coactivator-binding groove of estrogen receptorβ. *PNAS* 2006;103:9908-9911.

Wärnmark A, Treuter E, Gustafsson JA, Hubbard RE, Brzozowski AM, Pike ACW. Interaction of Transcriptional Intermediary Factor 2 Nuclear Receptor Box Peptides with the

Coactivator Binding Site of Estrogen Receptor α . The Journal of Biological Chemistry 2002;277:21862-21868.

Weihua Z, Andersson S, Cheng G, Simpson ER, Warner M, Gustafsson JA. Update on estrogen signaling. FEBS Lett 2003;546:17-24.

Wijayarante AL, McDonnell DP. The Human Estrogen Receptor- α Is a Ubiquitinated Protein Whose Stability Is Affected Differentially by Agonists, Antagonists, and Selective Estrogen Receptor Modulators. The Journal of Biological Chemistry 2001;276:35684-35692.

Wilkening RR, Ratcliffe RW, Tynebor EC, Wildonger KJ, Fried AK, Hammond ML, Mosley RT, Fitzgerald PMD, Sharma N, McKeever BM, Nilsson S, Carlquist M, Thorsell A, Locco L, Katz R, Frisch K, Birzin ET, Wilkinson HA, Mitra S, Cai S, Hayes EC, Schaeffer JM Rohrer SP. The discovery of tetrahydrofluorenones as a new class of estrogen receptor β -subtype selective ligands. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2006;16:3489-3494.

Wilson JD, Foster DW. Textbook of endocrinology 1985. 7e édition, Philadelphia, W.B. Saunders company, p.1413.

Wu YL, Yang X, Ren Z, McDonnell DP, Norris JD, Willson TM, Greene GL. Structural Basis for an Unexpected Mode of SERM-Mediated ER Antagonism. Molecular Cell 2005;18:413-424.

Yamasaki M. Total Synthesis of the Sesquiterpene (-)-Daucene. J Chem Soc Chem Commun 1972; 10:606-607.

Yamnik RL, Holz MK. mTOR/S6K1 and MAPK/RSK signaling pathways coordinately regulate estrogen receptor α serine 167 phosphorylation. FEBS letters 2010;584:124-128.

Zamaraeva MV, Hagelgansl AI, Abramovl AY, Ternovsky VI, Merzlyak PG, Tashmukhamedov BA, Saidkhodzjaev AI. Ionophoretic properties of ferutinin. Cell calcium 1997;4:235-241.

Zanoli P, Rivasi M, Zavatti M, Brusiani F, Vezzalini F, Baraldi M. Activity of single components of *Ferula hermonis* on male rat sexual behavior. Int J Impot Res 2005;17:513-8.

Zanoli P, Zavatti M, Geminiani E, Corsi L, Baraldi M. The phytoestrogen ferutinin affects female sexual behavior modulating ER α expression in the hypothalamus. Behavioural Brain Research 2009;199:283-287.

Zavatti M, Benelli A, Montanari C, Zanoli P. The phytoestrogen ferutinin improves sexual behavior in ovariectomized rats. Phytomedicine 2009;16:547-554.

Zavatti M, Resca E, Bertoni L, Maraldi T, Guida M, Carnevale G, Ferrari A, De Pol A. Ferutinin promotes proliferation and osteoblastic differentiation in human amniotic fluid and dental pulp stem cells. Life sciences 2013;92:993-1003.

Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang THM, Nephew KP. Identification and Characterization of Ovarian Cancer-Initiating Cells from Primary Human Tumors. Cancer Res 2008; 68(11): 4311-4320.

Zhao YX, Huang SZ, Ma QY, Mei WL, Dai HF. Two new sesquiterpenoids from *Daphne aurantica*. *Molecules* 2012;17:10046-10051.

Zheng H, Kavanagh JJ, Hu W, Liao Q, Fu S. Hormonal therapy in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2007;17:325-338.

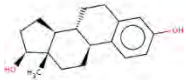
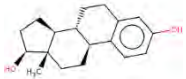
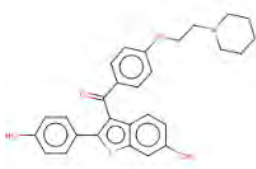
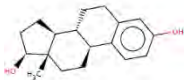
IX Annexe-1 : Collection de structures PDB et ligands associés

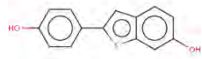
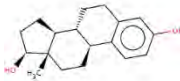
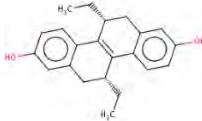
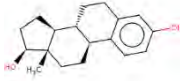
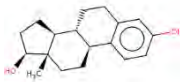
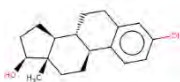
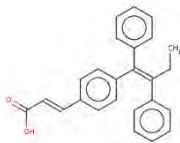
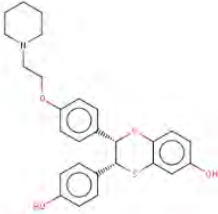
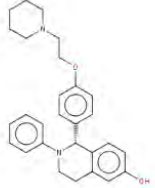
Les deux tableaux A-1 et A-2 suivants présentent l'ensemble des structures des RE α et RE β qui ont été utilisées dans la classification structurale, à la date de l'étude. Certaines de ces structures étant ligandées (au moins un composé chimique co-cristallographié et complexé dans le site de liaison du récepteur) les ligands correspondants sont également présentés dans les tableaux.

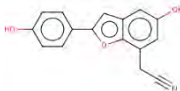
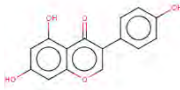
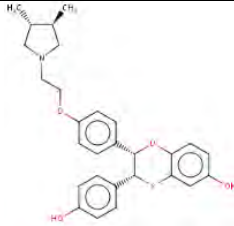
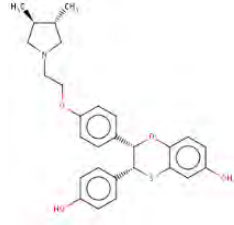
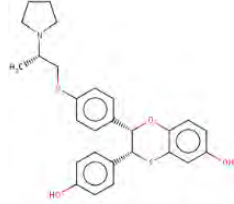
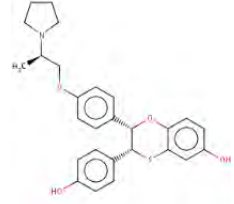
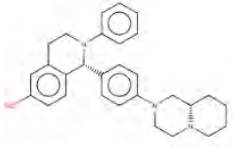
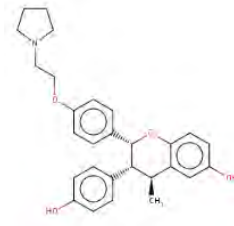
La structure est exprimée avec le code PDB (protéine, 4 lettres-chiffres, par exemple 1A52) et la résolution est exprimée en Å. La colonne Ligand comporte le nom usuel ou chimique associé à l'identificateur de ce ligand dans la PDB (HC, 3 lettres-chiffres, par exemple EST pour l'œstradiol).

Cas des RE α

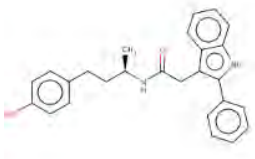
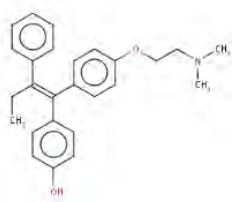
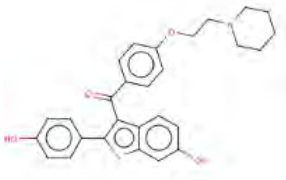
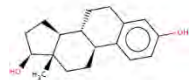
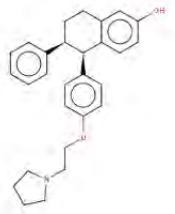
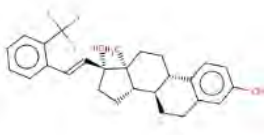
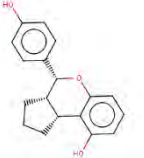
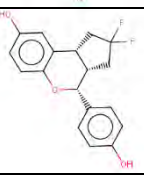
Tableau A-1: Les structures protéiques des RE α avec leurs ligands correspondants.

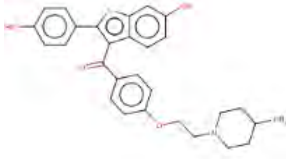
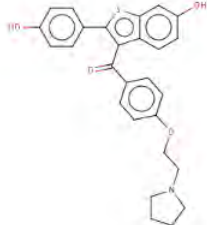
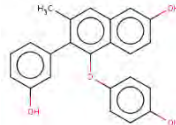
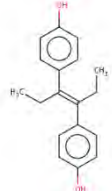
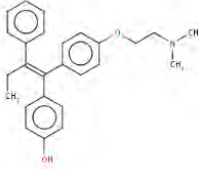
Structure	Résolution	Ligand		structure du ligand	Référence
1A52	2,80	OESTRADIOL	EST		Tanenbaum DM <i>et al.</i> , 1998
1ERE	3,10	OESTRADIOL	EST		Brzozowski AM <i>et al.</i> , 1997
1AKF	-	-		-	-
1ERR	2,60	RALOXIFENE	RAL		Brzozowski AM <i>et al.</i> , 1997
1G50	2,90	OESTRADIOL	EST		Eiler S <i>et al.</i> , 2001

1GWQ	2,45	RALOXIFENE CORE	ZWT		Warnmark A <i>et al.</i> , 2002
1GWR	2.40	OESTRADIOL	EST		Warnmark A <i>et al.</i> , 2002
1HCP	-	-		-	-
1HCQ	-	-		-	-
1L2I	1,95	(R,R)-5,11-CIS-DIETHYL-5,6,11,12-TETRAHYDROCHRYSENE-2,8-DIOL,	ETC		Shiau AK <i>et al.</i> , 2002
1PCG	2,70	OESTRADIOL	EST		Leduc AM <i>et al.</i> , 2003
1QKT	2,20	OESTRADIOL	EST		Gangloff M <i>et al.</i> , 2001
1QKU	3,20	OESTRADIOL	EST		Gangloff M <i>et al.</i> , 2001
1R5K	2,70	(2E)-3-{4-[(1E)-1,2-DIPHENYLBUT-1-ENYL]PHENYL} ACRYLIC ACID	GW5		Wu YL <i>et al.</i> , 2005
1SJ0	1,90	(2S,3R)-2-(4-(2-(PIPERIDIN-1-YL)ETHOXY)PHENYL)-2,3-DIHYDRO-3-(4-HYDROXYPHENYL)BENZO[B][1,4]OXATHIIN-6-OL	E4D		Kim S <i>et al.</i> , 2004
1UOM	2,28	2-PHENYL-1-[4-(2-PIPERIDIN-1-YL-ETHOXY)-PHENYL]-1,2,3,4-TETRAHYDRO-ISOQUINOLIN-6-OL	PTI		Renaud J <i>et al.</i> , 2003

1X7E	2,80	[5-HYDROXY-2-(4-HYDROXYPHENYL)-1-BENZOFURAN-7-YL]ACETONITRILE	244		Manas ES <i>et al.</i> , 2004
1X7R	2,00	GENEISTEIN	GEN		Manas ES <i>et al.</i> , 2004
1XP1	1,80	(2S,3R)-2-(4-{2-[(3R,4R)-3,4-DIMETHYLPYRROLIDIN-1-YL]ETHOXY}PHENYL)-3-(4-HYDROXYPHENYL)-2,3-DIHYDRO-1,4-BENZOXATHIIN-6-OL	AIH		Blizzard TA <i>et al.</i> , 2005
1XP6	1,70	(2S,3R)-2-(4-{2-[(3S,4S)-3,4-DIMETHYLPYRROLIDIN-1-YL]ETHOXY}PHENYL)-3-(4-HYDROXYPHENYL)-2,3-DIHYDRO-1,4-BENZOXATHIIN-6-OL	AIU		Blizzard TA <i>et al.</i> , 2005
1XP9	1,80	(2S,3R)-3-(4-HYDROXYPHENYL)-2-(4-{[(2S)-2-PYRROLIDIN-1-YLPROPYL]OXY}PHENYL)-2,3-DIHYDRO-1,4-BENZOXATHIIN-6-OL	AIJ		Blizzard TA <i>et al.</i> , 2005
1XPC	1,60	(2S,3R)-3-(4-HYDROXYPHENYL)-2-(4-{[(2R)-2-PYRROLIDIN-1-YLPROPYL]OXY}PHENYL)-2,3-DIHYDRO-1,4-BENZOXATHIIN-6-OL	AIT		Blizzard TA <i>et al.</i> , 2005
1XQC	2,05	(1S)-1-{4-[(9AR)-OCTAHYDRO-2H-PYRIDO[1,2-A]PYRAZIN-2-YL]PHENYL}-2-PHENYL-1,2,3,4-TETRAHYDROISOQUINOLIN-6-OL	AEJ		Renaud J <i>et al.</i> , 2005
1YIM	1,90	(2R,3R,4S)-3-(4-HYDROXYPHENYL)-4-METHYL-2-[4-(2-PYRROLIDIN-1-YLETHOXY)PHENYL]CHROMAN-6-OL	CM4		Tan Q <i>et al.</i> , 2005

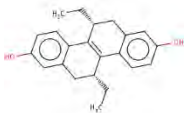
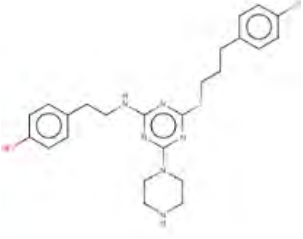
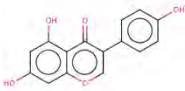
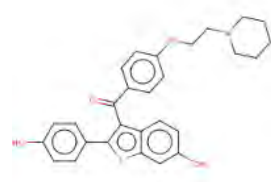
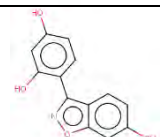
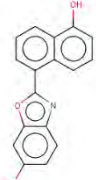

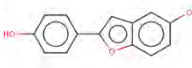
1YIN	2,20	(2R,3R,4S)-5-FLUORO-3-(4-HYDROXYPHENYL)-4-METHYL-2-[4-(2-PIPERIDIN-1-YLETHOXY)PHENYL]CHROMAN-6-OL,	CM3		Tan Q <i>et al.</i> , 2005
1ZKY	2,25	4-[(1S,2S,5S)-5-(HYDROXYMETHYL)-6,8,9-TRIMETHYL-3-OXABICYCLO[3.3.1]NON-7-EN-2-YL]PHENOL	689		Hsieh RW <i>et al.</i> , 2006
2AYR	1,90	6-(4-METHYLSULFONYLPHENYL)-5-[4-(2-PIPERIDIN-1-YLETHOXY)PHENOXY]NAPHTHALEN-2-OL	L4G		Hummel CW <i>et al.</i> , 2005
2B1V	1,80	4-[(1S,2S,5S)-5-(HYDROXYMETHYL)-8-METHYL-3-OXABICYCLO[3.3.1]NON-7-EN-2-YL]PHENOL	458		Hsieh RW <i>et al.</i> , 2006
2BJ4	2,00	4-HYDROXYTAMOXIFEN	OHT		Kong EH <i>et al.</i> , 2005
2ERD	-	-		-	-
2ERT	-	-		-	-
2FAI	2,10	4-[(1S,2S,5S,9R)-5-(HYDROXYMETHYL)-8,9-DIMETHYL-3-OXABICYCLO[3.3.1]NON-7-EN-2-YL]PHENOL	459		Hsieh RW <i>et al.</i> , 2006
2IOG	1,60	N-[(1R)-3-(4-HYDROXYPHENYL)-1-METHYLPROPYL]-2-[2-PHENYL-6-(2-PIPERIDIN-1-YLETHOXY)-1H-INDOL-3-YL]ACETAMIDE	IOG		Dykstra KD <i>et al.</i> , 2007

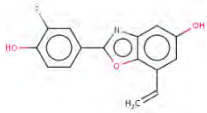
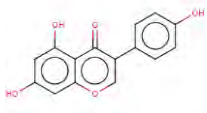
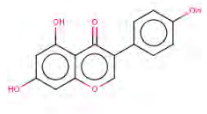
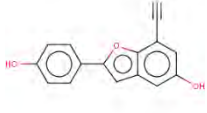
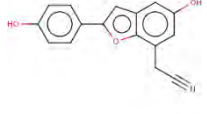
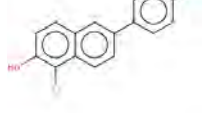
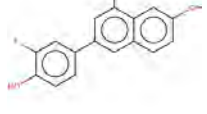
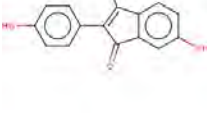
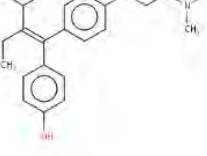
2IOK	2,40	N-[(1R)-3-(4-HYDROXYPHENYL)-1-METHYLPROPYL]-2-(2-PHENYL-1H-INDOL-3-YL)ACETAMIDE	IOK		Dykstra KD <i>et al.</i> , 2007
2JF9	2,10	4-HYDROXYTAMOXIFEN	OHT		Heldring N <i>et al.</i> , 2007
2JFA	2,55	RALOXIFENE	RAL		Heldring N <i>et al.</i> , 2007
2OCF	2,95	OESTRADIOL	EST		Koide A <i>et al.</i> , 2002
2OUZ	2,00	(5R,6S)-6-PHENYL-5-[4-(2-PYRROLIDIN-1-YLETHOXY)PHENYL]-5,6,7,8-TETRAHYDRONAPHTHALEN-2-OL	C3D		Vajdos FF <i>et al.</i> , 2007
2P15	1,94	(17BETA)-17-{(E)-2-[2-(TRIFLUOROMETHYL)PHENYL]VINYL}ESTRA-1(10),2,4-TRIENE-3,17-DIOL	EZT		Nettles KW <i>et al.</i> , 2007
2POG	1,84	(3AS,4R,9BR)-4-(4-HYDROXYPHENYL)-1,2,3,3A,4,9B-HEXAHYDROCYCLOPENTA[C]CHROMEN-9-OL	WST		Richardson TI <i>et al.</i> , 2007
2Q70	-	(3AS,4R,9BR)-2,2-DIFLUORO-4-(4-HYDROXYPHENYL)-1,2,3,3A,4,9B-HEXAHYDROCYCLOPENTA[C]CHROMEN-8-OL	DC8		Richardson TI <i>et al.</i> , 2007

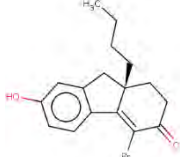
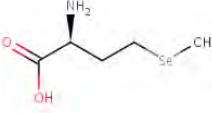
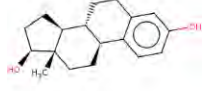
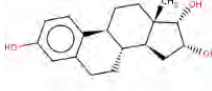
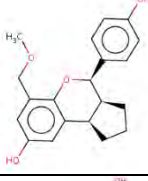
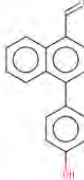
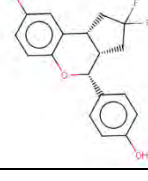
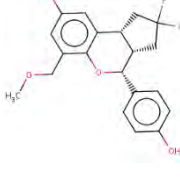
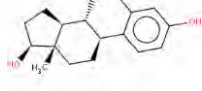
2R6W	2,00	[6-HYDROXY-2-(4-HYDROXYPHENYL)-1-BENZOTHIEN-3-YL]{4-[2-(4-METHYLPIPERIDIN-1-YL)ETHOXY]PHENYL}METHANONE	LLB		Dai SY <i>et al.</i> , 2008
2R6Y	-	[6-HYDROXY-2-(4-HYDROXYPHENYL)-1-BENZOTHIEN-3-YL][4-(2-PYRROLIDIN-1-YLETHOXY)PHENYL]METHANONE	LLC		Dai SY <i>et al.</i> , 2008
3DT3	2,40	5-(4-HYDROXYPHENOXY)-6-(3-HYDROXYPHENYL)-7-METHYLNAPHTHALEN-2-OL	369		Fang J <i>et al.</i> , 2008
3ERD	2,03	DIETHYLSTILBESTROL	DES		Shiau AK <i>et al.</i> , 1998
3ERT	1,90	4-HYDROXYTAMOXIFEN	OHT		Shiau AK <i>et al.</i> , 1998

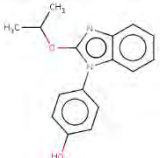
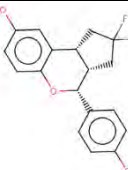
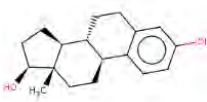
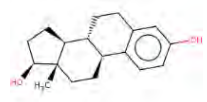
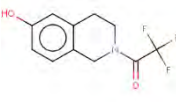
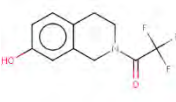
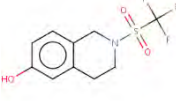
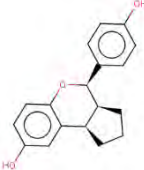
Cas des RE β

Tableau A-2: Les structures protéiques des RE β avec leurs ligands correspondants.

Structure	Résolution	Ligand		structure du ligand	Référence
1L2J	2,95	(R,R)-5,11-CIS-DIETHYL-5,6,11,12-TETRAHYDROCHRYSEN E-2,8-DIOL	ETC		Shiau AK <i>et al.</i> , 2002
1NDE	3,00	4-(2-{{[4-{{[3-(4-CHLOROPHENYL)PROPYL]SULFANYL}-6-(1-PIPERAZINYL)-1,3,5-TRIAZIN-2-YL]AMINO}ETHYL}PHE	MON		Henke BR <i>et al.</i> , 2002
1QKM	1,80	GENISTEIN	GEN		Pike ACW <i>et al.</i> , 1999
1QKN	2,25	RALOXIFENE	RAL		Pike ACW <i>et al.</i> , 1999
1U3Q	2,40	4-(6-HYDROXY-BENZO[D]ISOXAZOL-3-YL)BENZENE-1,3-DIOL	272		Malamas MS <i>et al.</i> , 2004
1U3R	2,21	2-(5-HYDROXY-NAPHTHALEN-1-YL)-1,3-BENZOOXAZOL-6-OL	338		Malamas MS <i>et al.</i> , 2004
1U3S	2,50	3-(6-HYDROXY-NAPHTHALEN-2-YL)-BENZO[D]ISOOXAZOL-6-OL	797		Malamas MS <i>et al.</i> , 2004
1U9E	2,40	2-(4-HYDROXY-PHENYL)BENZOFURAN-5-OL	397		Manas ES <i>et al.</i> , 2004

1X7B	2,30	2-(3-FLUORO-4-HYDROXYPHENYL)-7-VINYL-1,3-BENZOXAZOL-5-OL	041		Manas ES <i>et al.</i> , 2004
1X7J	2,30	GENISTEIN	GEN		Manas ES <i>et al.</i> , 2004
1X7R	2,00	GENISTEIN	GEN		Manas ES <i>et al.</i> , 2004
1X76	2,20	5-HYDROXY-2-(4-HYDROXYPHENYL)-1-BENZOFURAN-7-CARBONITRILE	697		Manas ES <i>et al.</i> , 2004
1X78	2,30	[5-HYDROXY-2-(4-HYDROXYPHENYL)-1-BENZOFURAN-7-YL]ACETONITRILE	244		Manas ES <i>et al.</i> , 2004
1YY4	2,70	1-CHLORO-6-(4-HYDROXYPHENYL)-2-NAPHTHOL	4NA		Mewshaw RE <i>et al.</i> , 2005
1YYE	2,03	3-(3-FLUORO-4-HYDROXYPHENYL)-7-HYDROXY-1-NAPHTHONITRILE	196		Mewshaw RE <i>et al.</i> , 2005
1ZAF	2,20	3-BROMO-6-HYDROXY-2-(4-HYDROXYPHENYL)-1H-INDEN-1-ONE	789		McDevitt RE <i>et al.</i> , 2005
2FSZ	-	4-HYDROXYTAMOXIFEN	OHT		Wang Y <i>et al.</i> , 2006

2GIU	2,20	(9aS)-4-BROMO-9a-BUTYL-7-HYDROXY-1,2,9,9a-TETRAHYDRO-3H-FLUOREN-3-ONE	FBR		Wilkening RR <i>et al.</i> , 2006
2IOJ	2,15	SELENOMETHIONINE	MSE		Tyagi R <i>et al.</i> <i>To be published</i>
2J7X	2,10	OESTRADIOL	EST		Pike ACW <i>et al.</i> <i>To be published</i>
2J7Y	1,80	(16ALPHA,17ALPHA)-ESTRA-1,3,5(10)-TRIENE-3,16,17-TRIOL	E3O		Pike ACW <i>et al.</i> <i>To be published</i>
2JJ3	2,28	(3AS,4R,9BR)-4-(4-HYDROXYPHENYL)-6-(METHOXYMETHYL)-1,2,3,3A,4,9B-HEXAHYDROCYCLOPENTA[C]CHROMEN-8-OL	JJ3		Norman BH <i>et al.</i> , 2007
2NV7	2,10	4-(4-HYDROXYPHENYL)-1-NAPHTHALDEHYDE OXIME	555		Mewshaw RE <i>et al.</i> , 2006
2Q70	1,95	(3AS,4R,9BR)-2,2-DIFLUORO-4-(4-HYDROXYPHENYL)-1,2,3,3A,4,9B-HEXAHYDROCYCLOPENTA[C]CHROMEN-8-OL	DC8		Richardson TI <i>et al.</i> , 2007
2QTU	2,53	(3aS,4R,9bR)-2,2-DIFLUORO-4-(4-HYDROXYPHENYL)-6-(METHOXYMETHYL)-1,2,3,3a,4,9b-HEXAHYDROCYCLOPENTA [c]CHROMEN-8-OL	3AS		Richardson TI <i>et al.</i> , 2007
2YJA	1,82	OESTRADIOL	EST		Philips C <i>et al.</i> , 2011

2YJD	1,93	4-(2-PROPAN-2-YLOXYBENZIMIDAZOL-1-YL)PHENOL	YJD		Philips C <i>et al.</i> , 2011
2Z4B	2,34	(3AS,4R,9BR)-2,2-DIFLUORO-4-(4-HYDROXYPHENYL)-1,2,3,3A,4,9B-HEXAHYDROCYCLOPENTA[C]CHROMEN-8-OL	DC8		Richardson TI <i>et al.</i> , 2007
3OLL	1,50	OESTRADIOL	EST		Mocklinghoff S <i>et al.</i> , 2010
3OLS	2,20	OESTRADIOL	EST		Mocklinghoff S <i>et al.</i> , 2010
3OMO	2,21	2-(TRIFLUOROACETYL)-1,2,3,4-TETRAHYDROISOQUINOLIN -6-OL	WV7		Mocklinghoff S <i>et al.</i> , 2011
3OMP	2,05	2-(TRIFLUOROACETYL)-1,2,3,4-TETRAHYDROISOQUINOLIN-7-OL	W14		Mocklinghoff S <i>et al.</i> , 2011
3OMQ	1,97	2-[(TRIFLUOROMETHYL)SULFONYL]-1,2,3,4-TETRAHYDROISOQUINOLIN-6-OL	W23		Mocklinghoff S <i>et al.</i> , 2011
2I0J	2,90	N-[(1R)-3-(4-HYDROXYPHENYL)-1-METHYLPROPYL]-2-[2-PHENYL-6-(2-PIPERIDIN-1-YLETHOXY)-1H-INDOL-3-YL]ACETAMIDE	IOG		Norman BH <i>et al.</i> , 2006

X Annexe-2 : Paramètres de calcul

Les paramètres suivants (issus d'un script MVD) sont utilisés pour les calculs dans le cas de la validation du filtre *in silico*, l'arrimage de la férutinine (Chapitre 2) et l'application aux analogues de la férutinine (Chapitre 3). Les calculs d'arrimage ou de post-arrimage (minimisation, calcul de scores, ...) se font de manière indépendante du calcul de RMSD (troisième ligne avant la fin) qui n'est activé que dans la phase de validation du filtre.

La valeur X correspond au système (cavités, espace de recherche, protéine, descripteurs de flexibilité, profil pharmacophorique, ligandothèque, ...) utilisé pour la modélisation (correspond à un nom de fichier au format XML). La valeur Y réfère au ligand qui est arrimé (un numéro entier qui correspond à son ordre d'apparition dans le fichier précédent).

PARSERSETTINGS	breakUnrealisticBonds=false ; combineMoleculeFragments=true ; useSybylForHybridization=true
DOCKSETTINGS	maxIterations=2000 ; runs=10 ; ignoreSimilarPoses=false ; IgnoreSimilarPosesThreshold=1 ; MaxPoses=5 ; MinimizeReceptor=2000,2000 ; poseOutput=mvdml ; createSmiles=true ; postMinimize=false ; postOptimizeHBonds=false
POSENAMEPATTERN [SID] \$NAME EVALUATOR TYPE MolDockGrid	
EVALUATOR	cropdistance=0 ; gridresolution=0,20 ; ligandes=true ; sp2sp2bond=true ; internalhbond=true ; hbond90=true ; SoftenPotential=true ; DisplaceWater=false ; tabuclustering=true,2,100,id
OPTIMIZERTYPE CUDA	
OPTIMIZER	poses=256 ; steps=1500 ; reevaluate=true ; cavity=true
TEMPLATE	strength=-500 ; useGrid=true ; gridResolution=0,4
LOAD "X" RMSD ligand[Y] DOCK Ligand[Y] NEW	

XI Annexe-3 : Etude biologique de la férutinine

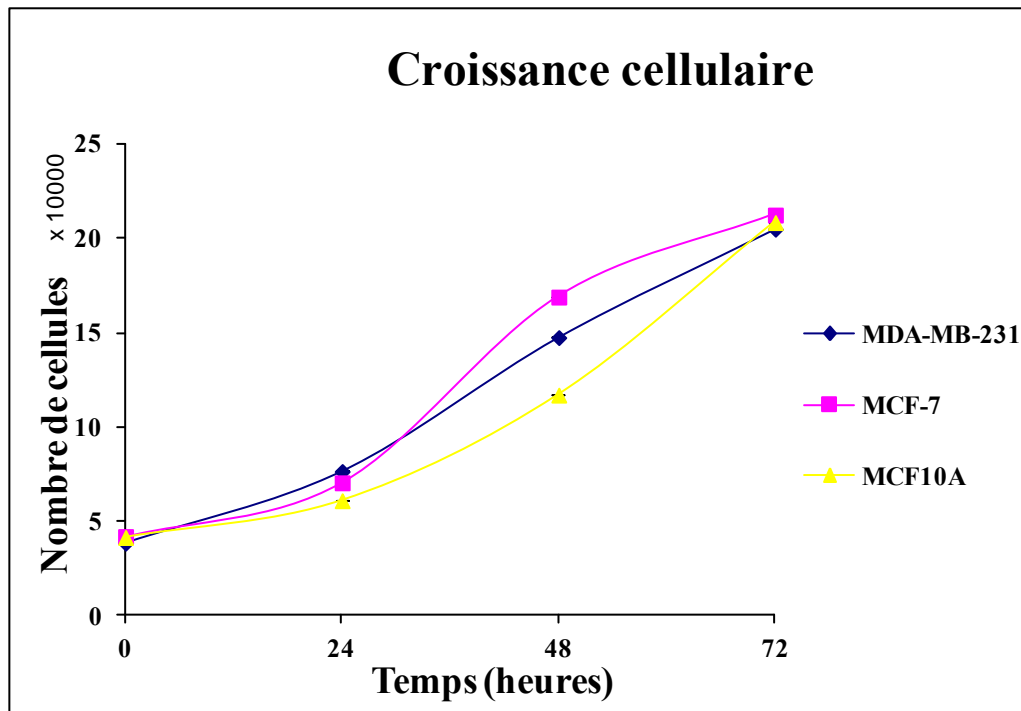


Figure A-1 : La croissance cellulaire des lignées cellulaire du sein.

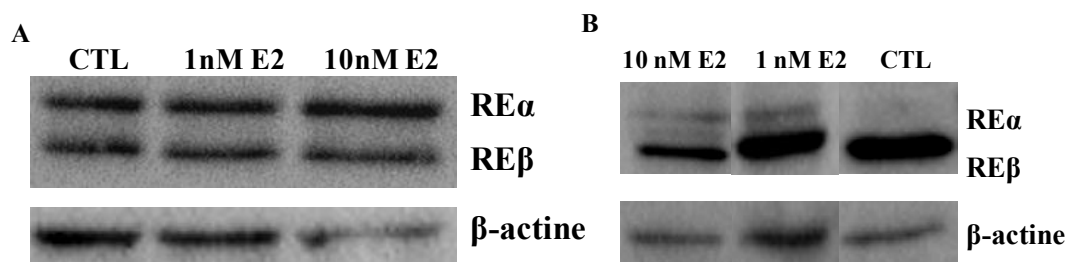


Figure A-2 : L'expression des REs chez les lignées cellulaires du sein. (A) MCF-7, (B) MDA-MB-231.

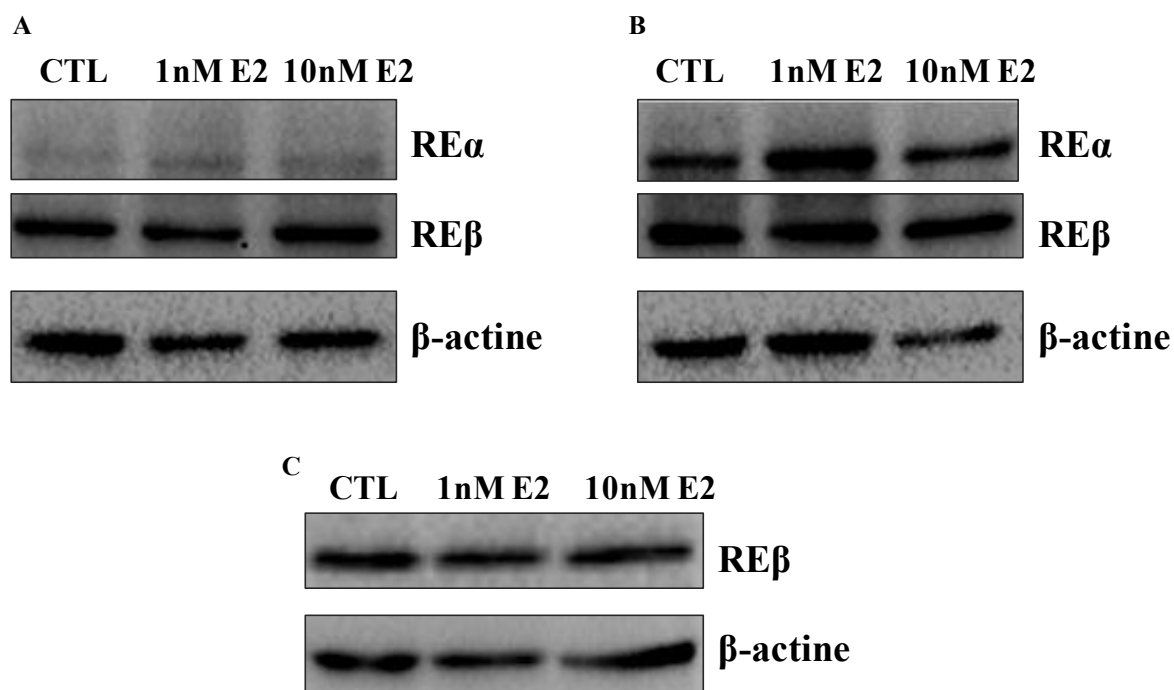


Figure A-3 : L'expression des REs chez les lignées cellulaires ovariennes. (A) SKOV-3, (B) IGROV-1, (C) OVCAR-3

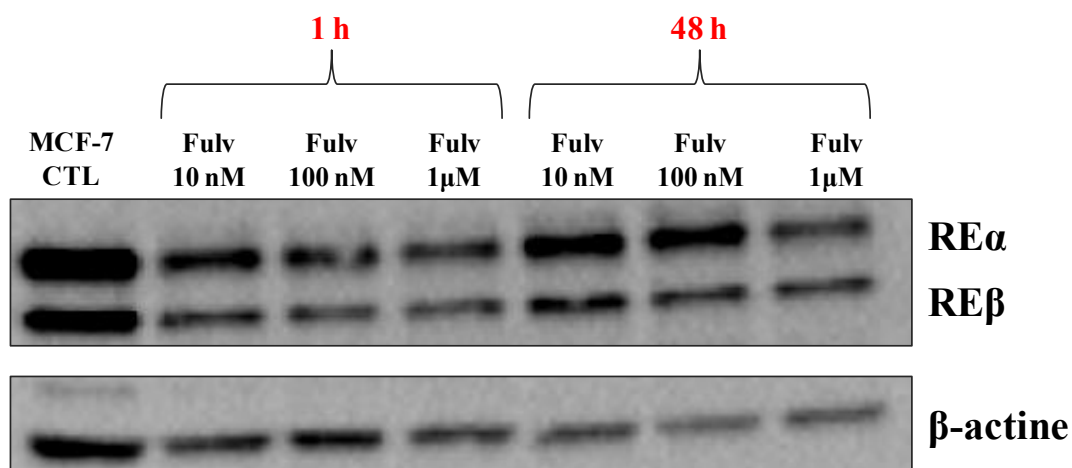


Figure A-4 : L'expression des REs chez les cellules MCF-7 traitées par le fulvestrant pendant 1 h et 48 h.

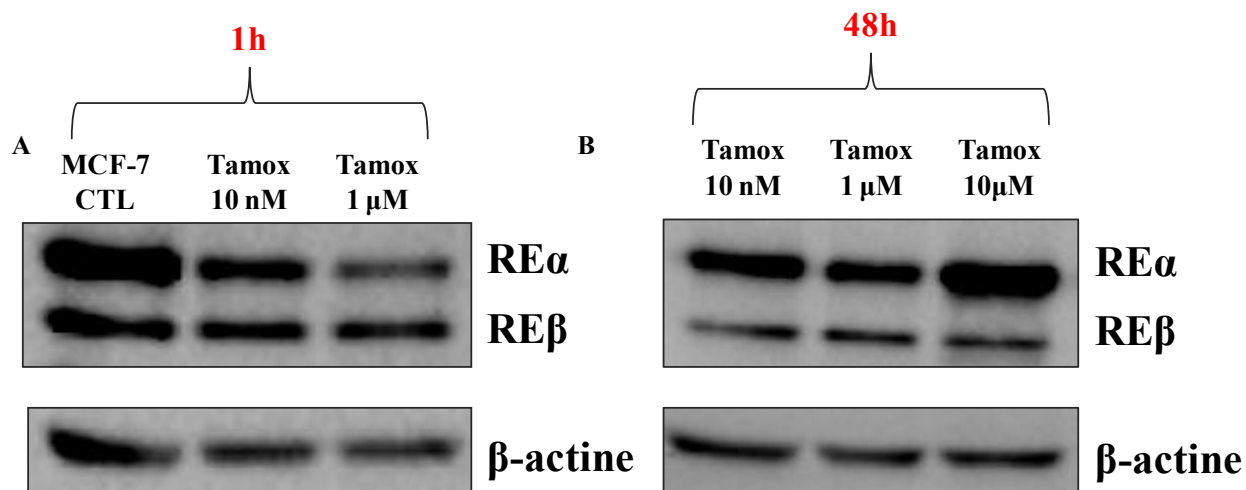


Figure A-5 : L'expression des REs chez les cellules MCF-7 traitées par le tamoxifene pendant (A) 1 h et (B) 48 h.

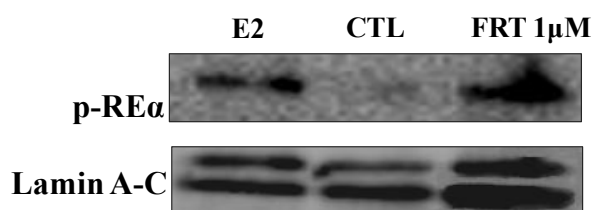


Figure A-6 : Fractionnement cellulaire des cellules MCF-7. La fraction nucléaire des cellules MCF-7 traitées par 1 μ M de FRT et 1 nM d'E2 pendant 1 h.

XII Annexe-4 : Etude de quelques régulateurs du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est sous la surveillance de protéines régulatrices de son bon fonctionnement, conférant la stabilité à la cellule lors d'un stimulus externe. Parmi ces protéines « *check points* », les cyclines D kinases, la p21 et la protéine suppresseur de tumeur p53.

Expression de p21

L'expression de la protéine a été analysée chez les deux lignées MCF-7 et MDA-MB-231 après 48 h de traitement par la férutinine.

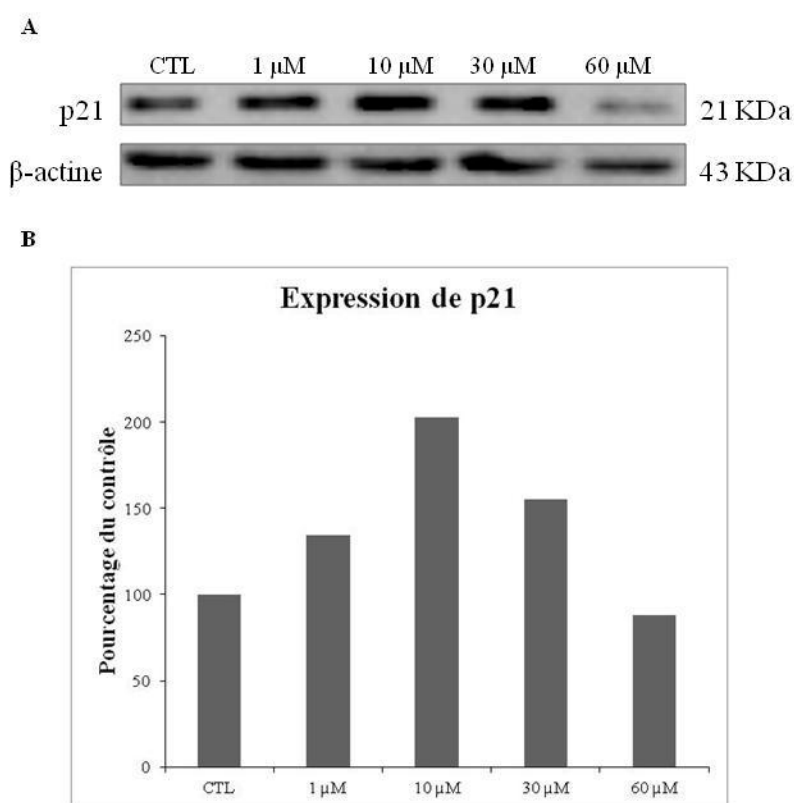


Figure A-7 : Analyse de l'expression de la protéine p21 dans la lignée MCF-7 suite au traitement par la férutinine. **(A)** Etude par « Western Blot » du niveau d'expression de la protéine après 48 h de traitement avec la férutinine, 100 μg de protéines sont déposées dans chaque puit. **(B)** Analyse par densitométrie après normalisation de l'expression de p21 par rapport à la protéine β-actine.

L'étude de l'expression de la protéine montre que la férutinine (1-30 μM) induit l'expression de p21 (1,5 à 2 fois plus importante par rapport au contrôle).

Expression de p53

La protéine p53 est un facteur de transcription jouant un rôle important dans la prolifération cellulaire, en régulant notamment l'activation d'inhibiteurs du cycle cellulaire.

Une analyse protéique de l'expression de la p53 a été réalisée par western blot (48 h après traitement avec la férutinine) uniquement chez la lignée MCF-7 puisque les cellules MDA-MB-231 n'expriment pas la protéine sauvage p53 mais sa forme mutée.

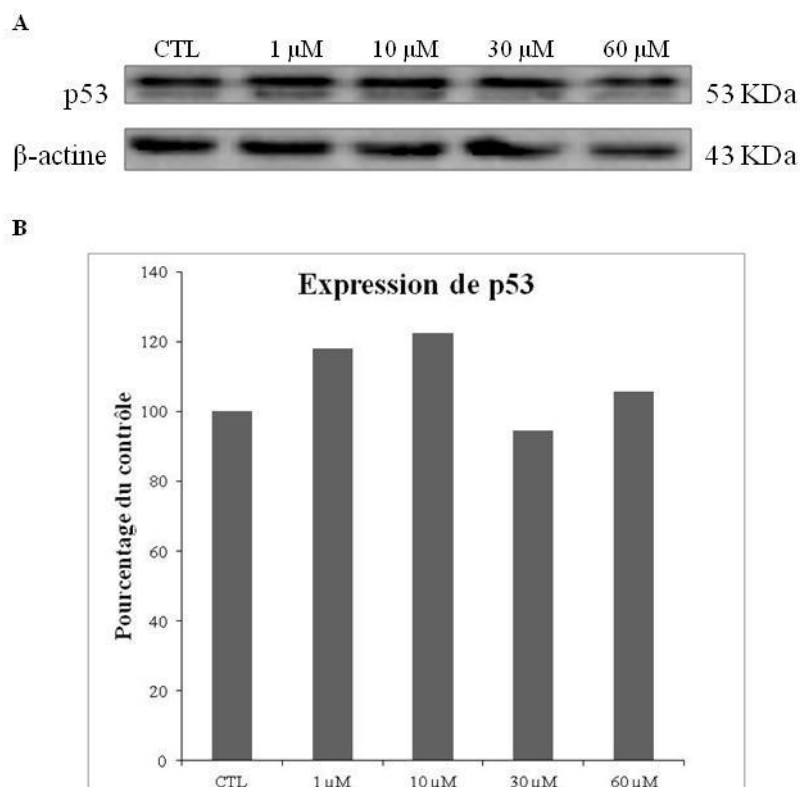


Figure A-8 : Analyse de l'expression de la protéine p53 dans la lignée MCF-7 suite au traitement par la férutinine. **(A)** Etude par « Western Blot » du niveau d'expression de la protéine après 1 h de traitement avec la férutinine, 100 μg de protéines sont déposées dans chaque puit. **(B)** Analyse par densitométrie après normalisation de l'expression de p21 par rapport à la protéine β-actine.

L'analyse de l'expression de la protéine a montré que l'expression est 1,2 fois plus importante lors du traitement par la férutinine par rapport au témoin à des concentrations de 1-10 μM. Par contre, la férutinine à des concentrations de 30-60 μM, n'induit pas un changement de l'expression de la p53. Ceci montre que le traitement par la férutinine ne modifie pas l'expression de la protéine p53 en comparaison au contrôle.

Etude de la férutinine et de ses analogues : hémisynthèse et activité anticancéreuse vis-à-vis des lignées cellulaires hormono-dépendantes

Les œstrogènes peuvent favoriser la croissance, la promotion et la progression des cancers hormono-dépendants tels que le cancer du sein, de la prostate et des ovaires. Certains métabolites secondaires de plantes constituent une source importante de phyto-œstrogènes, capables de réduire le risque du cancer en antagonisant les fonctions des hormones. La férutinine (FRT), est une phyto-œstrogène biologiquement active extraite des racines de *Ferula hermonis*, espèce endémique du Liban. Plusieurs études ont été menées sur l'activité œstrogénique et anticancéreuse de la FRT, cependant son activité cytotoxique sur les lignées de cancer œstrogéno-dépendantes n'a pas été élucidée. La FRT est connue pour son effet agoniste vis-à-vis des récepteurs aux œstrogènes α (RE α) et agoniste/antagoniste vis-à-vis des RE β . Dans un premier temps, la production de la FRT a été optimisée par une hémisynthèse à partir de l'hydrolyse basique de l'extrait brut. Son activité anticancéreuse sur des lignées du sein MCF-7 (RE α +, RE β +) et MDA-MB-231 (RE α -, RE β -), de la prostate PC-3 (RE α +, RE β +) et DU 145 (RE α -, RE β +) et 22Rv1 (RE α -, RE β -) et des ovaires OVCAR-3 (RE α +, RE β +) et SKOV-3 (RE α muté, RE β +) et IGROV-1 (RE α -, RE β -) a été testée. Un effet biphasique a été observé sur la prolifération des cellules du carcinome mammaire MCF-7, où son activité proliférative a été corrélée avec la stimulation des REs. La FRT est capable à des concentrations élevées d'inhiber la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses et d'induire un arrêt du cycle cellulaire au niveau de la phase pré G0/G1 agissant ainsi *via* un mécanisme pro-apoptotique. L'efficacité de la férutinine réside dans son pouvoir à cibler spécifiquement les cellules souches/progénitrices cancéreuses chez les lignées cellulaires étudiées qui sont à la base de la réémission tumorale. Cependant, son activité antiproliférative est considérée moyenne puisqu'elle ne peut pas déclencher à des faibles concentrations une activité pure antagoniste des œstrogènes. Les travaux de thèse se sont ensuite focalisés sur la synthèse de composés analogues de la FRT en conservant sa structure indispensable à son activité. Nous avons élaboré un filtre *in silico* de chimiothèques d'antagonistes potentiels des REs. Ce nouvel outil d'arrimage moléculaire a guidé la synthèse des analogues de la FRT en améliorant leur fixation en position antagoniste dans le site de liaison des REs. L'arrimage moléculaire de la férutinine dans le site actif des REs a confirmé structuralement sa double compétence œstrogénique (agoniste/antagoniste) observée *in vitro*. Une douzaine d'analogues de la FRT a été synthétisée et testée pour son pouvoir antiprolifératif sur les lignées cancéreuses considérées. Des résultats prometteurs ont été obtenus notamment pour trois analogues sur les lignées cancéreuses mammaires (**3c'** et **2c'**), prostatiques (**2c'**) et ovariennes (**3b**). Ces composés ont montré une sélectivité vis-à-vis des lignées cancéreuses. Ces analogues constitueront alors des candidats pour une éventuelle plateforme de développement d'agents anticancéreux.

Mots-clés : *Ferula hermonis*, Férutinine, hémisynthèse, cancer hormono-dépendant, récepteurs aux œstrogènes, cellules souches cancéreuses.

Ferutinin and its analogues: hemisynthesis and anticancer activity against hormone-dependent cancer cell lines

Estrogens are key regulators of cell growth in hormone-dependent cancers such as breast, prostate and ovarian. Phyto-estrogens are a diverse group of plant-derived compounds, exhibiting potential benefits for chemoprevention by antagonizing the function of estrogens. Ferutinin (FRT) is the main active phyto-chemical extracted from the endemic plant of Lebanon, *Ferula hermonis*. Several studies were conducted on the estrogenic and anti-proliferative activities of FRT; nevertheless, its cytotoxic activity against estrogen-dependent cancers is not yet elucidated. FRT has been reported as agonist to estrogen receptor α (ER α) and agonist/antagonist to ER β . FRT production was first optimized by hemi-synthesis from basic hydrolysate of crude root extract. The anticancer properties of FRT was assessed against breast (MCF-7, MDA-MB-231), prostate (PC-3, DU 145, 22Rv1) and ovarian (OVCAR-3, SKOV-3, and IGROV-1) cancer cell lines. A biphasic effect was observed on the proliferation of mammary MCF-7 cell line, where the proliferative activity was correlated to ER stimulation. FRT inhibited the proliferation of all studied cell lines at high concentrations and induced a pre G0/G1 cell cycle arrest *via* a pro-apoptotic mechanism of action. FRT targeted the enriched population of cancer stem cells/progenitors which is responsible for tumor reemission. However, its antiproliferative activity is considered weak since it cannot trigger at low concentrations pure estrogen antagonistic activity. This project emphasizes next on the synthesis of FRT analogues by preserving its active structure. We have created an *in silico* filter of chemical compounds that might act as potential antagonists to ERs. This novel molecular docking tool was used to design FRT derivatives by enhancing their antagonist position inside the binding cavity of ERs. Docking results of FRT in the binding site of ERs confirmed structurally the dual potency that exerts this molecule (agonist/antagonist) *in vitro*. A list of FRT analogues were synthesized and tested for their anti-proliferative activity against the studied cell lines. Promising results were obtained with three ferutinin analogues on the proliferation of breast (**3c'** and **2c'**), prostate (**2c'**) and ovarian (**3b**) cancer cell lines. These compounds were also shown to be more selective to cancer cell lines. The cytotoxic properties of these analogues suggest that they could be promoted as potential candidates for useful anticancer therapy.

Key words: *Ferula hermonis*, Ferutinin, hemisynthesis, hormone-dependant cancer, estrogen receptors, cancer stem cells.